



UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUIZ GALLO”
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRIA EN CIENCIAS



**AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y RENDIMIENTO DE BACTERIAS
PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS PROVENIENTES DE
RESIDUOS ORGÁNICOS DE LAMBAYEQUE, ABRIL – NOVIEMBRE,
2015**

TESIS

**PRESENTADA PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

PRESENTADA POR:

Br. CARLOS ALBERTO DÁVILA LATORRE

Br. MORAYMA ELISA WONG BARRENECHEA

LAMBAYEQUE - PERÚ

2017

**AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y RENDIMIENTO DE BACTERIAS
PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS PROVENIENTES DE
RESIDUOS ORGÁNICOS DE LAMBAYEQUE, ABRIL – NOVIEMBRE,
2015**

PRESENTADO POR:

Br. Carlos Alberto Dávila Latorre
AUTOR

Br. Morayma Elisa Wong Barrenechca
AUTOR

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán
ASESORA

APROBADO POR:

Dr. JUAN LÓPEZ CUBAS
PRESIDENTE

M.Sc. CÉSAR MARIO DÍAZ HERRERA
SECRETARIO

M.Sc. VICTORIA LORA VARGAS
VOCAL

**LAMBAYEQUE, PERÚ
2017**

DEDICATORIA

A Dios y a nuestras familias por su apoyo
incondicional en cada aventura de nuestras vidas.

AGRADECIMIENTO

A nuestra asesora de tesis Dr. Carmen Rosa Carreno Farfán por su apoyo y guía en el desarrollo de esta investigación y a las personas que nos motivaron y colaboraron en la ejecución del presente estudio.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	i
Agradecimiento.....	ii
Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas	iv
Resumen	v
Abstract	vi
Introducción.....	1
Capítulo I: ANÁLISIS DEL OBJETO DE ESTUDIO	4
1.1 Ubicación.....	4
1.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	4
1.3 Metodología	7
1.3.1 Obtención y pretratamiento de las muestras de residuos orgánicos	7
1.3.2 Aislamiento de bacterias	7
1.3.3 Detección y selección de bacterias productoras de gránulos de PHA	11
1.3.4 Determinación del tiempo requerido para alcanzar el mayor número de células con gránulos de PHA	11
1.3.5 Identificación fenotípica de bacterias	11
1.3.6 Rendimiento de polihidroxialcanoatos de bacterias nativas	13
a. Obtención de la curva de patrón para la cuantificación de biomasa	13
b. Proceso fermentativo	15
c. Determinación de la concentración de biomasa y PHA	15

d. Cálculo del rendimiento de PHA	18
1.3.7 Análisis de los datos	18
Capítulo II: MARCO TEÓRICO.....	21
2.1 Antecedentes bibliográficos.....	21
2.2 Base teórica.....	25
2.2.1 Biosíntesis de PHA	28
2.2.2 Rutas metabólicas	29
Capítulo III: RESULTADOS	33
3.1 Bacterias aisladas de residuos orgánicos	33
3.2 Bacterias productoras de gránulos de PHA	33
3.3 Bacterias seleccionadas e identificadas fenotípicamente	42
3.4 Rendimiento de PHA.....	42
Capítulo IV: DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES	52
RECOMENDACIONES	53
Capítulo IV: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica del mercado Modelo, provincia de Chiclayo, región Lambayeque 2016 (https://maps.google.com.pe).	5
Figura 2. Ubicación geográfica del mercado Moshoqueque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque 2016 (https://maps.google.com.pe)	5
Figura 3. Ubicación geográfica del mercado Central, provincia de Chiclayo, región Lambayeque 2016 (https://maps.google.com.pe)	6
Figura 4. Residuos orgánicos en el mercado Moshoqueque de Chiclayo, 2016.	8
Figura 5. Obtención de muestra de residuos orgánicos en el mercado Modelo de Chiclayo, 2016.	8
Figura 6. Muestras de diferentes residuos orgánicos.	9
Figura 7. Muestras de residuos orgánicos fragmentados.	9
Figura 8. Suspensión de residuos orgánicos en solución salina esterilizada con Tween 80.	10
Figura 9. Tinción de bacterias con Sudan Negro B.....	12
Figura 10. Inoculación de bacterias en caldo Fermentación.....	14
Figura 11. Lectura de absorbancia en espectrofotómetro de luz visible.	14
Figura 12. Pesaje de la biomasa bacteriana.	16
Figura 13. Biomasa bacteriana tratada con hipoclorito de sodio.....	16
Figura 14. Biomasa bacteriana tratada con hipoclorito de sodio (a) y cloroformo (b).	17
Figura 15. Observación de dos fases después de la centrifugación de la biomasa bacteriana con hipoclorito de sodio (a) y cloroformo (b).	19
Figura 16. Extracción del cloroformo conteniendo el PHA.	19

Figura 17. Pesaje del tubo de ensayo conteniendo el PHA	20
Figura 18. Polihidroxialcanoato adherido a las paredes del tubo de ensayo.	20
Figura 19. Estructura química de polihidroxialcanoatos producidos por bacterias (Gómez,2013).	26
Figura 20. Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de P3HB a partir de carbohidratos (González et al., 2013).....	30
Figura 21. Ruta para la síntesis de PHA de cadena media en <i>Pseudomonas</i> spp. a partir de ácidos grasos y carbohidratos (González et al., 2013)	31
Figura 22. Bacterias desarrolladas en Agar Mac Conkey (a) y agar nutritivo (b).	34
Figura 23. Frecuencia de bacterias Gram positivas y negativas aisladas de residuos orgánicos	34
Figura 24. Porcentaje de cultivos bacterianos según residuo orgánico de procedencia.....	35
Figura 25. Gránulos de polihidroxialcanoatos en bacterias teñidas con Sudan Negro B.	35
Figura 26. Frecuencia de bacterias Gram positivas y negativas productoras de gránulos de polihidroxialcanoatos.	36
Figura 27. Porcentaje de bacterias productoras de gránulos de PHA según residuo orgánico de procedencia	36
Figura 28. Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de bacterias productoras de PHA.	45
Figura 29. Polihidroxialcanoato, PHA, producido por <i>Bacillus</i> sp. RO227.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principales monómeros que conforman los PHA producidos por microorganismos...	26
Tabla 2.	Propiedades físicas de diferentes tipos de PHA y su comparación con las observadas en plásticos derivados del petróleo.	27
Tabla 3.	Número de células con gránulos de PHA en bacterias Gram negativas cultivadas en caldo Fermentación por 60 horas en Lambayeque, abril-noviembre 2015.	36
Tabla 4.	Número de células con gránulos de PHA en bacterias Gram positivas cultivadas en caldo Fermentación por 60 horas en Lambayeque, abril-noviembre 2015.	38
Tabla 5.	Cultivos de bacterias seleccionadas por el mayor número de gránulos de PHA en Lambayeque, abril-noviembre 2015.	40
Tabla 6.	Características diferenciales del género <i>Bacillus</i>	42
Tabla 7.	Características diferenciales de los géneros <i>Burkholderia</i> y <i>Pseudomonas</i>	42
Tabla 8.	Número de células bacterianas con gránulos de PHA en diferentes tiempos de incubación en Lambayeque, abril-noviembre 2015.	43
Tabla 9.	Valores de absorbancia (600nm) de biomasa de bacterias productoras de PHA	43
Tabla 10.	Absorbancia (600nm) de biomasa de bacterias productoras de PHA.....	44
Tabla 11.	Concentración (gL ⁻¹) de biomasa de bacterias productoras de PHA en Lambayeque, abril-noviembre 2015.	45
Tabla 12.	Rendimiento Y (p/x) de polihidroxialcanoatos por bacterias aisladas de residuos orgánicos en Lambayeque, abril-noviembre 2015.....	46

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar el rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por bacterias aisladas de residuos orgánicos de Lambayeque.

Muestras de grasas procedentes de la comercialización de carnes, residuos de flores, frutas y verduras se sembraron en agar nutritivo y agar Mc Conkey para aislar las bacterias. Éstas se cultivaron en caldo Fermentación con glicerol como fuente de carbono durante 72 horas, se colorearon con Sudán Negro B y observaron al microscopio óptico para detectar gránulos de PHA. Los diez cultivos con el mayor número de células con gránulos de PHA se llevaron a fermentación con glicerol, durante 72 horas y se determinó, el rendimiento de PHA en función de la biomasa ($Y_{p/x}$).

Se obtuvieron 206 cultivos de bacterias, correspondientes a los residuos de flores (36%), frutas (33%), verduras (22%) y grasas de carnes (9%). En el 65% de los cultivos de bacterias se detectaron gránulos, utilizando la tinción Sudan Negro B. Los diez cultivos de bacterias que alcanzaron el mayor número de células con gránulos de PHA se seleccionaron y se identificaron en los géneros *Bacillus* (50%), *Burkholderia* (40%) y *Pseudomonas* (10%). El rendimiento de PHA en función de la biomasa $Y_{p/x}$ fue de $0,077\text{gg}^{-1}$ (*Bacillus* sp. RO062) y $0,751\text{gg}^{-1}$ (*Bacillus* sp. RO227). Estas bacterias tienen potencial para la producción de PHA a mayor escala.

Palabras clave: Polihidroxialcanoatos, bacterias, gránulos de PHA, residuos orgánicos

ABSTRACT

The present investigation was carried out with the objective of determining the yield of polyhydroxyalkanoates produced by bacteria isolated from organic waste matter of Lambayeque. Samples of fats from the commercialization of meats, flower residues, fruits and vegetables were cultivated on nutritious agar to isolate the bacteria. These were cultured in broth fermentation with glycerol as a carbon source for 72 hours, stained with Sudan Black B and observed at the optical microscope to detect PHA granules. The ten cultures with the highest number of cells with PHA granules were taken to Fermentation with Glycerol for 72 hours and the yield of PHA as a function of the biomasa ($Y_{p/x}$), was determined.

206 bacterial cultures were obtained, corresponding to the residues of flowers (36%), fruits (33%), vegetables (22%) and meat fats (9%). In 65% of the bacterial cultures, granules were detected, using the Sudan Black B stain. The ten bacterial cultures that reached the highest number of cells with PHA granules were selected and identified in the *Bacillus* genera (50%), *Burkholderia* (40%) and *Pseudomonas* (10%). The yield of PHA as a function of biomass $Y_{p/x}$ was 0.077gg⁻¹ (*Bacillus* sp RO062) to 0.751gg⁻¹ (*Bacillus* sp RO227). These bacteria have potential for the production of PHA on a larger scale.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates, bacteria, PHA granules, organic waste

INTRODUCCIÓN

Los plásticos tienen cualidades muy versátiles, entre las que destacan su durabilidad y resistencia, por lo que se usan en una amplia variedad de productos imprescindibles para el estilo de vida actual. Su consumo anual se ha incrementado de 5 millones de toneladas en 1950 a cerca de 200 millones en el 2010; sin embargo, al ser resistentes a la biodegradación, su uso extensivo genera residuos que se acumulan en el ambiente a una tasa de 25 millones de toneladas al año, 40% de las cuales son dispuestas en rellenos sanitarios y cientos de miles de toneladas son arrojadas al suelo y ambientes marinos, contaminando el ambiente y causando muerte de animales que los ingieren accidentalmente (González, Meza, Gonzalez y Córdova, 2013). Un informe del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente señaló que el 2005 se encontraron más de 13 000 fragmentos de residuos plásticos flotando sobre cada kilómetro cuadrado del océano (Serrano, 2010).

El problema de la disponibilidad y el precio del petróleo, que es la materia prima para la producción de plásticos comerciales se une a la contaminación causada por los petroplásticos. Actualmente se utiliza 5% del petróleo disponible mundialmente para fabricar 200 millones de toneladas de plásticos por año; sin embargo, para el 2100 se estima que la demanda será de 2000 millones de toneladas anuales, para la cual será requerido el 50% del petróleo disponible en ese momento, con el consecuente impacto en los precios y disponibilidad de los plásticos (González et al., 2013).

Los plásticos biodegradables como los polihidroxialcanoatos (PHA) constituyen una alternativa para los plásticos derivados del petróleo (Baca et al., 2010). Los PHA son poliésteres lineales de ácidos (R)-3 hidroxicarboxílicos (R)-HA, sintetizados por las bacterias en condiciones de desequilibrio nutricional, constituyendo reservas de carbono y energía, que pueden ser utilizadas por las células en ambientes desfavorables. Dependiendo del organismo, la producción de PHA puede alcanzar más del 90% del peso seco de la célula (Khanna & Srivastava, 2005)

Los PHA son no tóxicos, biodegradables, biocompatibles y presentan características físico-químicas similares a los petroplásticos o derivados del petróleo; no obstante, los costos de producción son relativamente altos respecto a los plásticos derivados del petróleo. En el 2010 el costo del PHB, uno de los PHA más estudiados fue estimado en 2,13 a 6,25 dólares kg^{-1} , superando ampliamente 1,45 dólares kg^{-1} de petroplástico (Gómez, 2013).

La investigación de bacterias en los residuos orgánicos posibilita la obtención de cultivos capaces de acumular grandes cantidades del polímero y que a la vez presenten crecimiento rápido, bajo diversas condiciones ambientales y en sustratos de bajo costo (Cardona, Mora y Marín, 2013; Gómez, 2013). Las bacterias obtenidas en el presente estudio constituirán la base para la investigación de PHA en un proceso económico y ambientalmente amigable, así como también para la obtención de PHA con propiedades físicas nuevas mejoradas, que permitan ampliar su uso en aplicaciones de alto valor agregado.

Por lo expuesto se planteó el siguiente problema: ¿Cuáles son las bacterias productoras de Polihidroxialcanoatos provenientes de los residuos orgánicos de Lambayeque y cuál es el rendimiento de polihidroxialcanoatos en relación al tiempo de incubación?; siendo el objetivo general: Determinar el rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por bacterias aisladas de

residuos orgánicos en Lambayeque. Los objetivos específicos fueron: Aislar bacterias en residuos orgánicos de los mercados de la provincia de Chiclayo en Lambayeque, detectar gránulos de PHA en las bacterias utilizando la tinción de Sudan Negro B, seleccionar e identificar los diez cultivos de bacterias con el mayor número de células con gránulos de PHA y determinar el rendimiento de PHA. La hipótesis planteada fue: Las bacterias aisladas de residuos orgánicos alcanzan un rendimiento de PHA mayor a $0,70\text{gg}^{-1}$ o 70% de su peso seco después de 60 horas de incubación.

CAPITULO I

ANÁLISIS DEL OBJETO DE ESTUDIO

1.1 Ubicación

Las muestras de residuos orgánicos se colectaron en los mercados Moshoqueque, Modelo y Central de la provincia de Chiclayo (Figuras 1,2 y 3), ubicada en Lambayeque, al norte de la costa peruana, a 18 msnm, 05°28'36" y 07°14'37" de latitud sur y 79°41'30" y 80°37'23" de longitud oeste del Meridiano de Greenwich (Municipalidad Provincial de Lambayeque, abril-noviembre 2015.).

Los PHA constituyen una alternativa de reemplazo a los plásticos derivados del petróleo; no obstante, los costos de producción son muy elevados y no resultan competitivos frente a los petroplásticos (Gómez, 2013). Los mercados de la provincia de Chiclayo generan en promedio 16 toneladas de residuos orgánicos por día (Olmedo, 2015), los cuales presentan microorganismos con diversa actividad metabólica como la síntesis de PHA. Éstos deben ser investigados, con la perspectiva que una vez caracterizados y seleccionados utilicen los mismos residuos orgánicos para la producción de PHA a bajo costo, en un proceso no contaminante del ambiente.

1.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación fue descriptivo y la hipótesis se contrastó mediante el diseño de una sola casilla (Hernández, Fernández y Baptista, 2014).



Figura 1. Ubicación geográfica del mercado Moshoqueque, provincia de Chiclayo, región Lambayeque 2016 (<https://maps.google.com.pe>).



Figura 2. Ubicación geográfica del mercado Modelo, provincia de Chiclayo, región Lambayeque 2016 (<https://maps.google.com.pe>).

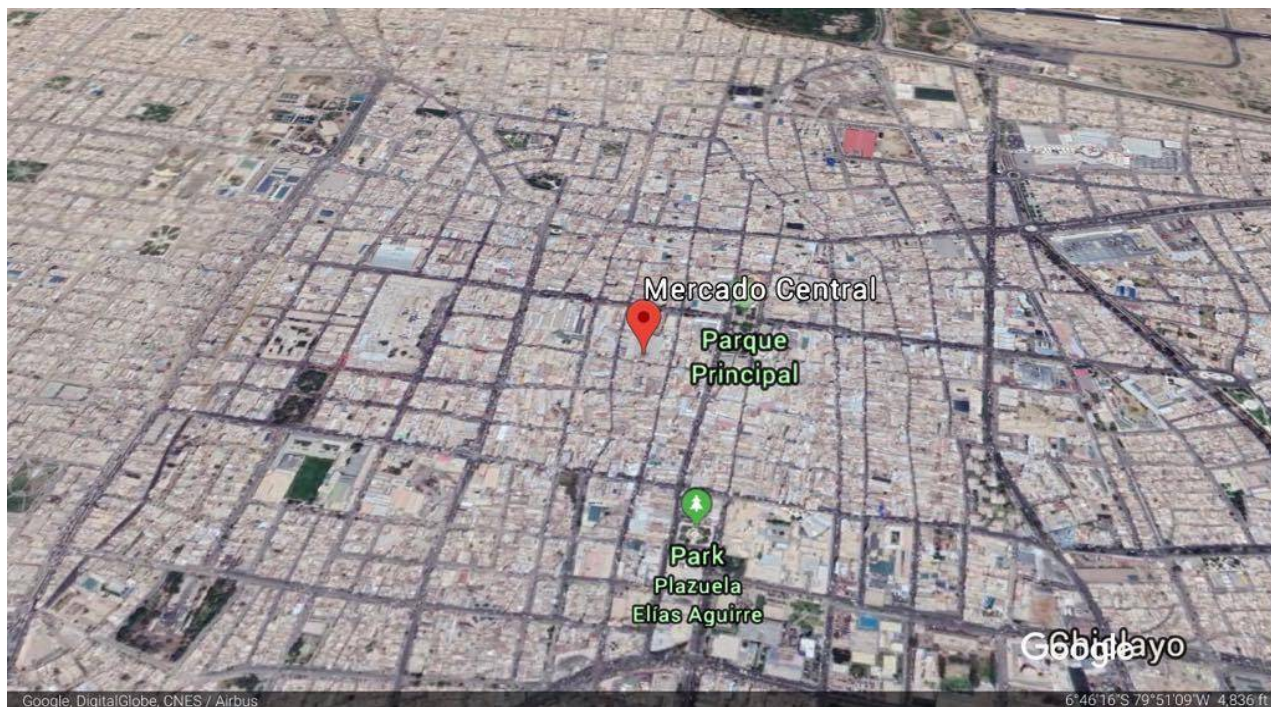


Figura 3. Ubicación geográfica del mercado Central, provincia de Chiclayo, región Lambayeque 2016 (<https://maps.google.com.pe>).

1.3 Metodología

1.3.1 Obtención y pretratamiento de las muestras de residuos orgánicos

Las 54 muestras de residuos orgánicos se colectaron en los mercados (Anexo 1). Las muestras, correspondientes a grasas procedentes de la comercialización de carnes (12), residuos de flores (14), frutas (14) y verduras (14) se depositaron en bolsas de polietileno (Figuras 4 a 6), debidamente identificadas e inmediatamente se transportaron en una caja térmica ($10 \pm 1^\circ\text{C}$) al Laboratorio de Microbiología y Parasitología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Los residuos orgánicos se deshidrataron (Collazos y Ortiz, 2014) bajo sombra, durante 3 días, se cortaron en fragmentos de $0,5\text{ cm}^2$ (Figura 7) del material obtenido se tomaron 10g y se depositaron en frascos con 90 mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,87% p/v) más Tween 80 al 0,1%. La suspensión obtenida o dilución 10^{-1} se homogenizó manualmente durante 15 minutos para favorecer el desprendimiento de las células bacterianas y después se realizaron dos diluciones adicionales hasta 10^{-3} (Figura 8).

1.3.2 Aislamiento de bacterias

En las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} se tomaron alícuotas y se sembraron mediante la técnica de agotamiento y estría (Collazos y Ortiz, 2014) en agar nutritivo y Mac Conkey (Anexo 2), suplementados con 45mg de Fluconazol para inhibir el crecimiento de hongos (Alvarado y Valderrama, 2014). Después de la incubación a 30°C hasta por 48 horas las colonias de bacterias desarrolladas se agruparon según su morfología, se seleccionó una representante de cada morfotipo, se realizaron tinciones de Gram y se cultivaron en agar tripticosa soya (TSA) a 30°C durante 24 horas, constituyendo los cultivos puros de bacterias Gram positivas y Gram negativas que se guardaron en refrigeración (8°C).



Figura 4. Residuos orgánicos en el mercado Moshoqueque de Chiclayo, 2016.



Figura 5. Obtención de muestras de residuos orgánicos en el mercado Modelo de Chiclayo, 2016.



Figura 6. Muestras de diferentes residuos orgánicos.



Figura 7. Muestras de residuos orgánicos fragmentados.



Figura 8. Suspensión de residuos orgánicos en solución salina esterilizada con Tween 80.

1.3.3 Detección y selección de bacterias productoras de gránulos de PHA

Las bacterias se cultivaron por triplicado en 5 mL de caldo para la producción de PHA: caldo Fermentación (Becerra, 2013) con glicerol (5mL L^{-1}) como fuente de carbono (Anexo 2) a 30°C en aerobiosis, 125 rpm durante 72 horas. A continuación, se tomaron alícuotas de los caldos cultivados, se realizaron extensiones en láminas portaobjetos, se fijaron al calor (frotis) y se colorearon con Sudan Negro B (Figura 9, Anexo 3) durante 15 minutos. Después de la decoloración con xilol (20 segundos), se secaron a temperatura ambiente ($25 - 28^{\circ}\text{C}$) y se colorearon con safranina durante 1 minuto (Cerrone, 2011). La presencia de gránulos grisáceos en el interior de las células bacterianas rosadas se consideró positivo para la detección de gránulos de PHA (Baca y Sánchez, 2010). Se cuantificó el número de células con gránulos de PHA en cinco campos microscópicos por cultivo bacteriano y se seleccionaron los diez cultivos con el mayor número de células con gránulos de PHA por campo microscópico.

1.3.4 Determinación del tiempo requerido para alcanzar el mayor número de células con gránulos de PHA

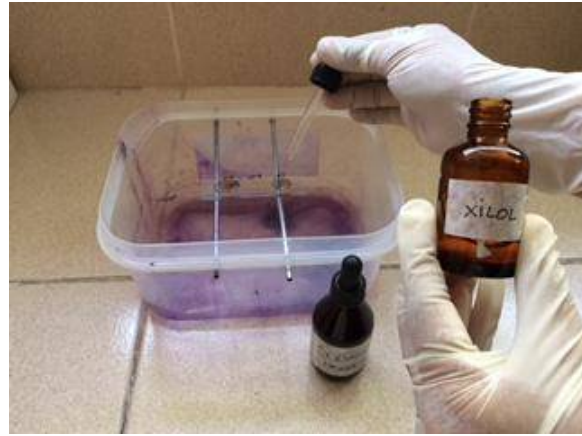
Los diez cultivos bacterianos seleccionados se llevaron al caldo Fermentación con glicerol (5mL L^{-1}) para la producción de PHA, a 30°C , en aerobiosis, con agitación constante (125 rpm) y se realizaron frotis y coloración con Sudan Negro B a las 24, 48, 72 y 96 horas. De esta manera, se determinó el tiempo óptimo requerido para alcanzar el mayor número de células con gránulos de PHA (Flores e Idrogo, 2015).

1.3.5 Identificación fenotípica de bacterias

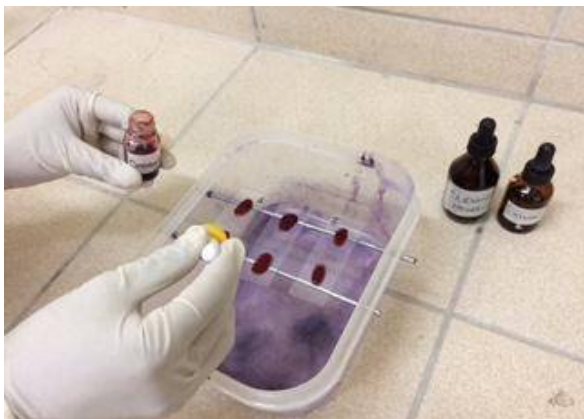
La identificación del género de los diez cultivos de bacterias seleccionadas se realizó en función a las características morfológicas y fisiológicas, según el Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa (Holt, Krieg, Sneath, Staley & Willians, 1994).



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 9. Tinción de bacterias con Sudan Negro B, (a) Adición del colorante, (b) Decoloración con xilol, (c) Tinción con safranina, (d) Lavado.

1.3.6 Rendimiento de polihidroxialcanoatos de bacterias nativas

Con los diez cultivos de bacterias seleccionadas se determinó la concentración de biomasa y PHA y se calculó el rendimiento $Y (p/x)$.

a. Obtención de la curva de patrón para la cuantificación de biomasa

Las bacterias productoras de gránulos de PHA seleccionadas se cultivaron por triplicado en el caldo correspondiente, durante el tiempo requerido para observar turbidez y estandarizar la concentración con el tubo 1 del nefelómetro de Mc Farland (Guzmán, Hurtado, Carreño y Caos, 2017). A continuación, se inocularon (5%: 1mL) en frascos de 100 mL de capacidad con 19 mL de caldo correspondiente (Figura 10), a 30 °C, durante el tiempo requerido para alcanzar el mayor número de células con gránulos de PHA, previamente determinado y se tomaron por triplicado 2 mL, uno para determinar la absorbancia en el espectrofotómetro de luz visible (Modelo Tenso Med NV-203) a 600 nm (tubo 1) y otro para realizar diluciones decimales hasta 10^{-3} (tubos 2,3,4), a los que también se les determinó la absorbancia (Figura 11). Los 140 mL restantes de caldo correspondiente, se centrifugaron (Modelo GT 119-200) a 3500 rpm, durante 20 minutos. El sedimento o biomasa se lavó rápidamente con solución salina (NaCl 0,85% p/v) esterilizada, se centrifugó y deshidrató en la estufa (Modelo HINOTEK GRX-9023) a 45 °C, hasta obtener peso constante (Baca, Sánchez, Carreño y Mendoza, 2010).

La biomasa deshidratada se pesó en una balanza de precisión (Digital scale, 500g x 0,01g) y el valor obtenido se expresó en gramos por litro ($g L^{-1}$), correspondiendo a la absorbancia del tubo 1. Asimismo, el valor de la biomasa se dividió entre 10, 100, 1000, correspondiendo a la absorbancia de los tubos 2, 3, 4 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Con los valores obtenidos se determinó la ecuación de regresión, para calcular la biomasa de cada cultivo bacteriano.



Figura 10. Inoculación de bacterias en caldo Fermentación.



Figura 11. Lectura de absorbancia en espectrofotómetro de luz visible.

b. Proceso fermentativo

En el proceso fermentativo (Guzmán et al., 2017) las bacterias productoras de PHA reactivadas en caldo Fermentación con glicerol (5 mL L^{-1}) se cultivaron en 5 mL del caldo correspondiente por tiempo suficiente para observar turbidez (tubo 1 del Nefelómetro de Mc Farland), constituyendo el inóculo bacteriano. A continuación, se inocularon (5%:1mL) por triplicado en frascos de 100 mL de capacidad con 19 mL de Caldo Fermentación y se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, por el tiempo óptimo requerido para alcanzar el mayor número de células con gránulos de PHA previamente determinado. Posteriormente, se cuantificó la biomasa y PHA producidos.

c. Determinación de la concentración de biomasa y PHA

La concentración de biomasa de cada bacteria fue determinada por turbidimetría a las 24, 48, 72, 96 horas. Se tomó 1 mL de cada cultivo, se registra la absorbancia a 600nm y los valores de biomasa se calcularon en la ecuación de regresión de la curva patrón entre absorbancia y biomasa seca, previamente obtenida.

Para cuantificar el PHA, los 19 mL de caldo se centrifugaron a 3500 rpm, durante 20 minutos. El sedimento o biomasa celular obtenida se lavó rápidamente con solución salina ($\text{NaCl } 0,85\text{ \% p/v}$), se centrifugó y se deshidrató en estufa a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta obtener un peso constante, el cual se determinó con una balanza analítica. Con la biomasa, se recuperó el PHA producido por cada bacteria (Figura 12). Según el protocolo de Law & Slepecky (1961), mencionado por Cholula (2005), en el tubo con la biomasa deshidratada se agregó 1mL de hipoclorito de sodio al 5%, para debilitar la membrana celular y facilitar el proceso de extracción (Figura 13) y después de 2 horas, se adicionó 1 mL de cloroformo para separar la biomasa del polímero, observándose dos fases: una inferior transparente y una superior amarillenta (Figura 14).



Figura 12. Pesaje de la biomasa bacteriana.

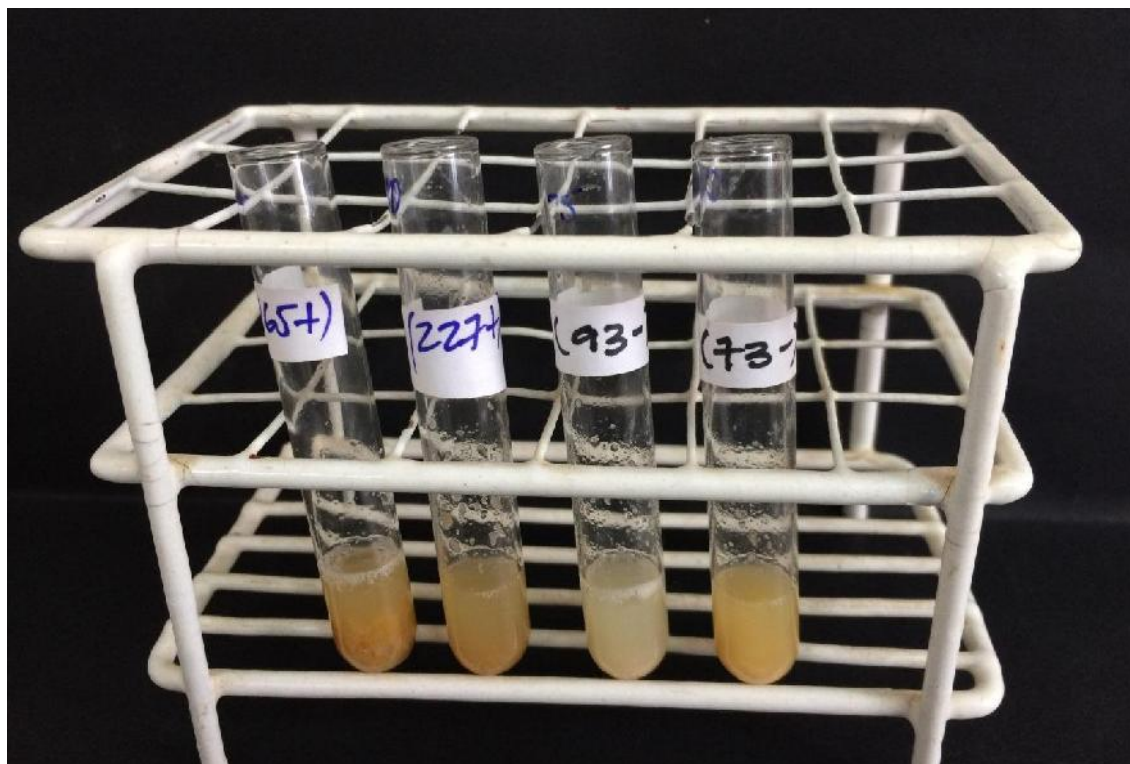


Figura 13. Biomasa bacteriana tratada con hipoclorito de sodio.

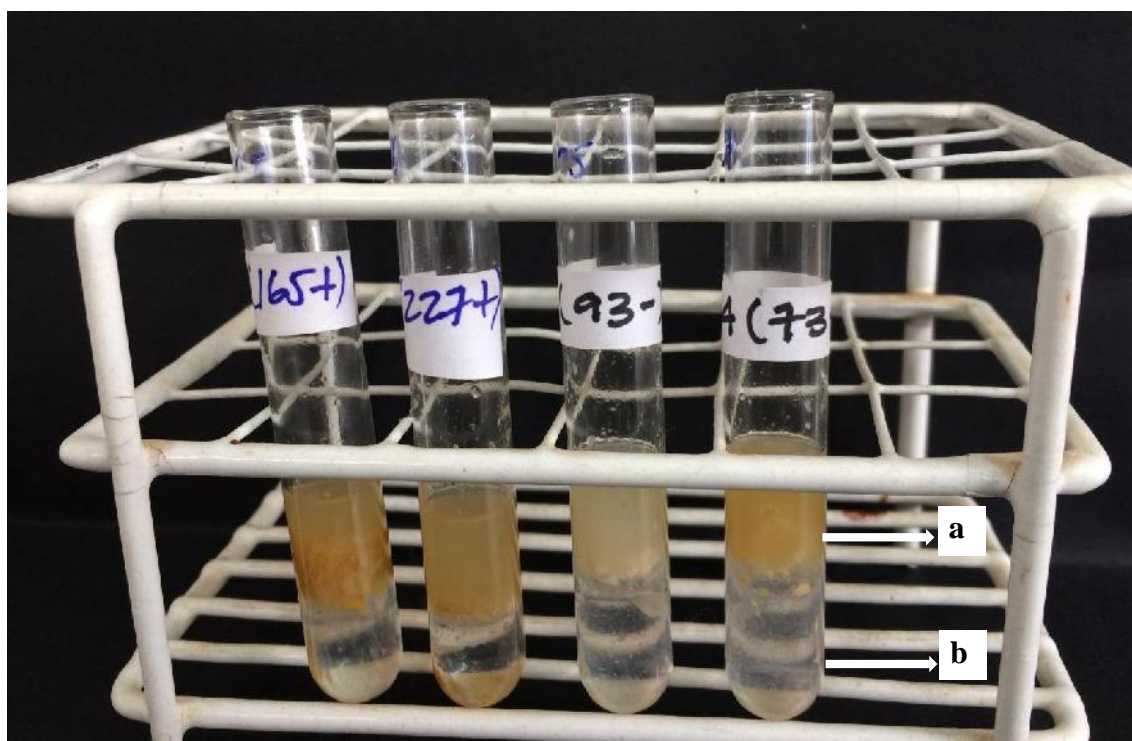


Figura 14. Biomasa bacteriana tratada con hipoclorito de sodio (a) y cloroformo (b).

Transcurridos 20 minutos los tubos se centrifugaron a 3500 rpm, durante 5 minutos y nuevamente se observaron dos fases (Figura 15), una superior constituida por hipoclorito con restos celulares y una inferior conteniendo el cloroformo con el polímero PHA. Con una pipeta Pasteur se extrajo el cloroformo con el polímero se depositó en un tubo de 10x100mm, previamente pesado (P_i) en una balanza de precisión (Figura 16) y se llevó a estufa a 40 °C, por tiempo suficiente para la evaporación del cloroformo.

El tubo conteniendo el PHA se pesó (P_f) y la diferencia entre este peso menos al peso inicial (P_i) constituyó el PHA obtenido (Figuras 17,18). Para verificar la naturaleza del polímero obtenido las muestras se diluyeron en 1,5 mL de H_2SO_4 80%, se calentaron por 30 minutos a 90 °C en baño maría, se enfriaron a temperatura ambiente (28 °C), se depositaron en celda de cuarzo y se realizó un “barrido” en el espectrofotómetro de luz ultravioleta UNICO S-2150, en el rango de 220 a 250 nm. La absorbancia de un pico máximo a 235nm fue considerada positiva para el PHA. Acontinuación, se leyó la absorbancia de cada muestra de PHA a 235nm.

d. Cálculo del rendimiento de PHA

El $Y(p/x)$ es el coeficiente de rendimiento del producto en relación a la biomasa o cantidad del producto obtenido por cantidad de biomasa formada (gg^{-1}) y se calculó dividiendo los gramos de PHA entre los gramos de biomasa (Dorán ,1998):

$$Y\left(\frac{p}{x}\right) = \frac{P-P_o}{X-X_o} = \frac{P}{X}$$

1.3.7 Análisis de los datos

Los valores obtenidos en la concentración de biomasa y PHA de las bacterias se ordenaron en tablas y figuras que permitieron analizar la cinética de la producción, durante un determinado tiempo (Hernández et al., 2014). Se utilizaron los programas de Microsoft Office Word y Microsoft Office Excel 2010.

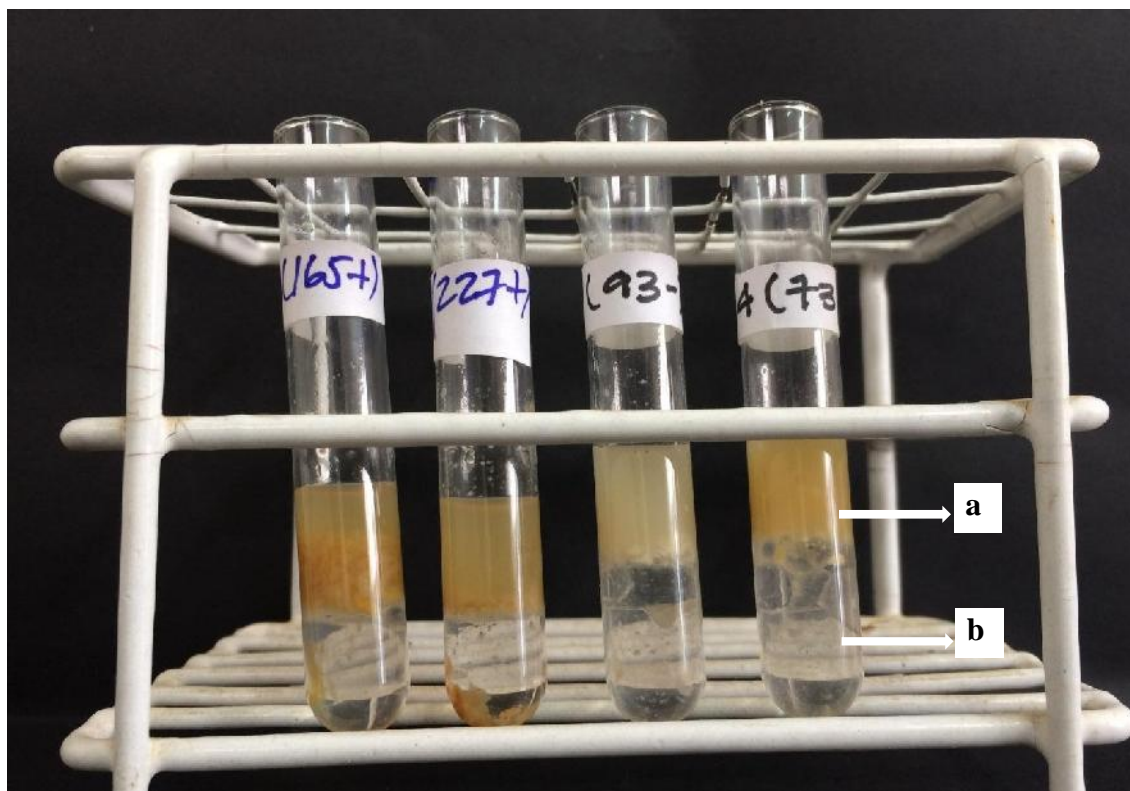


Figura 15. Observación de dos fases después de la centrifugación de la biomasa bacteriana tratada con hipoclorito de sodio (a) y cloroformo (b).



Figura 16. Extracción del cloroformo conteniendo el PHA.

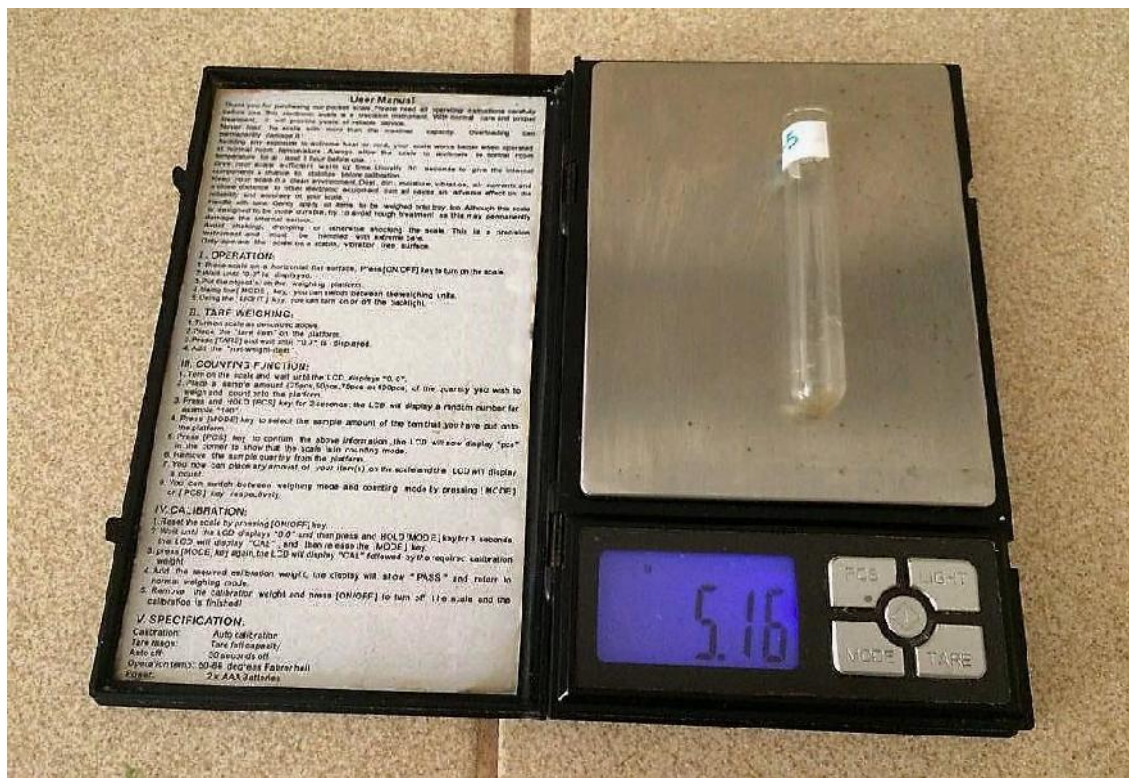


Figura 17. Pesaje del tubo de ensayo conteniendo el PHA

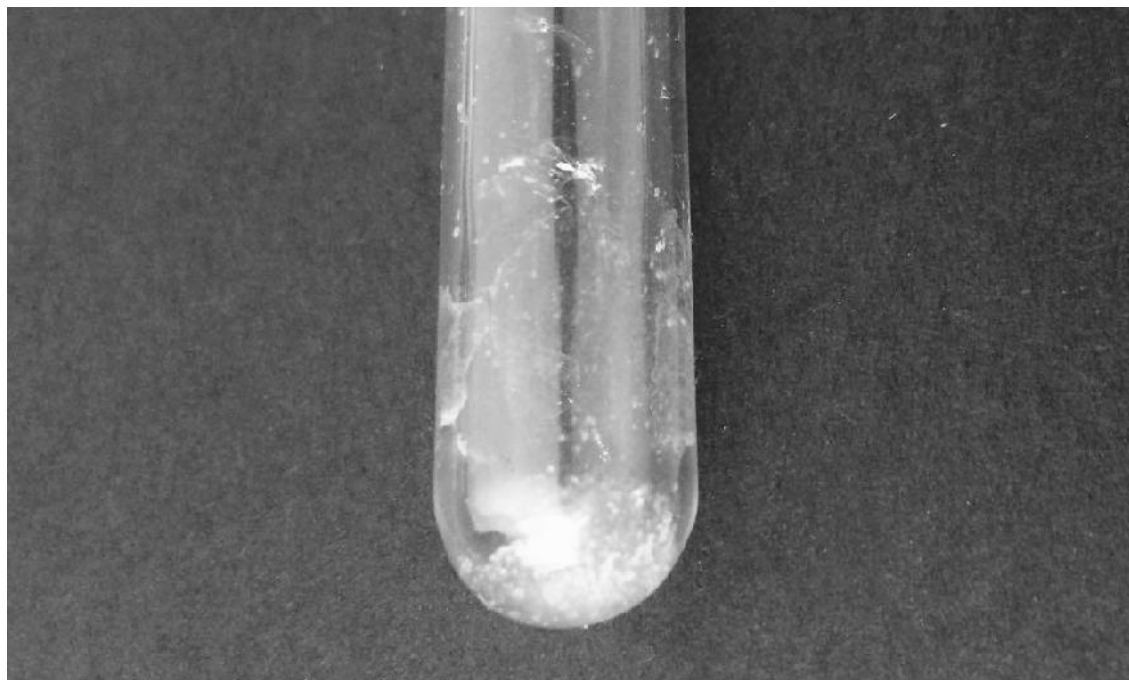


Figura 18. Polihidroxialcanoato adherido a las paredes del tubo de ensayo.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes bibliográficos

Los PHA son ideales para sustituir a los plásticos sintéticos; sin embargo, se requiere investigar bacterias capaces de crecer en sustrato baratos y cuyo rendimiento en la acumulación del polímero sea aceptable. En este contexto, se aislaron bacterias productoras de PHA en muestras de suelo. El medio de cultivo utilizado fue suplementado con Rojo Nilo al 0,1% y después de la incubación a 30°C, por 48 horas, se seleccionaron las colonias bacterianas con fluorescencia naranja, bajo el transiluminador de luz UV, a 340nm. La tinción con Sudan Negro B demostró gránulos de PHA en las células de doce colonias, entre las que solo *Bacillus mycoides* acumuló más de 300 mgL⁻¹ de PHA en el medio de cultivo. La caracterización del polímero por cromatografía de gases identificó el Poli-(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato), con un grado de cristalinidad y punto de fusión menores al del PHB, aspectos que lo hacen más interesante para la aplicación comercial (Fernández, Ortíz y Edmundo, 2005).

La producción de polímeros biodegradables es una estrategia del sector azucarero mundial. Se investigó una metodología para el aislamiento y caracterización del polí-B-hidroxibutirato producido por *Bacillus megaterium*. La bacteria fue cultivada en caldo miel de caña o remolacha 1%(p/v); pH 7,0; 0,7 vvm de aire; 30°C, durante 20 horas. El crecimiento bacteriano se monitoreó por espectrofotometría a 660 nm y con la biomasa se obtuvo PHB por tratamiento con hipoclorito de sodio, surfactante dodecil sulfato de sodio y solvente cloruro de metileno, destacando con más de 95% de pureza y recuperación, la digestión con

hipoclorito de sodio. El polímero se caracterizó por cromatografía de filtración en gel (GPC Max) y Colorimetría Diferencial de Barrido, presentando un PM de 400 kDa, temperatura de fusión de 175°C y temperatura de transición vítrea de 7°C. Se demostró la posibilidad de utilizar a escala industrial un procedimiento barato para la purificación de PHB (Bello, Zinn, Brandl y Otero, 2008).

Con el objetivo de obtener actinomicetos con capacidad para acumular PHA, se recolectaron muestras de suelo rizosférico de *Vitis vinífera* “vid”. Las muestras se diluyeron y se sembraron en agar avena, aislando 30 actinomicetos. La tinción con azul de Nilo permitió identificar en tres aislados la presencia de gránulos intracelulares fluorescentes del tipo PHA. Estas bacterias fueron cultivadas 8 días, a 25°C, en agitación y después se recuperó y cuantificó el polímero, determinando un rendimiento de 27,48% en peso seco. El análisis molecular identificó el actinomiceto con el mayor rendimiento de PHA, como *Streptomyces subutilus*, considerándose promisorio para la producción de PHA (Franco, Gómez, Núñez y Martínez, 2009).

Con el objetivo de determinar la concentración de PHA de *Azospirillum* spp. se colectaron raíces de *Lycopersicum esculentum* Mill. “tomate” y *Oryza sativa* L “arroz”. Las bacterias se aislaron de fragmentos de raíces previamente desinfectadas y sembradas en medio NFb semisólido, donde las bacterias fijadoras de nitrógeno se reconocieron por una película blanquecina bajo la superficie. Se aislaron 96 colonias, 48 de tomate y 48 de arroz, identificándose *A. lipoferum* y *A. brasilense*. Se realizó un proceso de fermentación en lote alimentado discontinuo, utilizando como medio de producción caldo *Azotobacter* modificado. El cultivo se alimentó con una solución saturada de ácido málico cada 12 horas y se realizaron tinciones con Sudan Negro B, para seleccionar las bacterias con el mayor número de gránulos de

PHA. La concentración de PHA alcanzó un máximo de $0,661 \text{ gL}^{-1}$ en *A. lipoferum* aislada de tomate y $0,738 \text{ gL}^{-1}$ con *A. brasilense* de tomate. Se demostró que *A. lipoferum* KMT-73 y *A. brasilense* KMT-19 son promisorias para la producción de PHA (Baca et al., 2010).

La producción de PHA se incrementa en condiciones desfavorables. En este contexto, se obtuvieron 17 aislados bacterianos en áreas urbanas contaminadas y 13 en áreas montañosas no contaminadas. Las 30 bacterias fueron Gram negativas y se identificaron como *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Enterobacter*. Mediante la tinción con Sudan Negro B se demostró la presencia de gránulos de PHA y en la cuantificación, los mayores valores alcanzados con las bacterias de áreas urbanas fueron de 50,4; 40,6 y 37%, en comparación con 45,8; 42,4 y 37,6% de las áreas no contaminadas. Los genes *phaC*_{1/C2} fueron amplificados en las bacterias, obteniéndose un fragmento de 540 pares de bases, correspondiente al gen responsable de la síntesis de PHA (Razzaq, Jamil, Naheed & Hasnain, 2010).

En suelos contaminados con residuos del beneficio de *Furcraea bedinghausii* “fique” se aislaron 248 colonias bacterianas, se realizaron tinciones con rojo y azul de Nilo, detección por PCR del gen *phaC* y las bacterias positivas a dichas pruebas fueron identificadas utilizando análisis filogenético de secuencias del 16S ADNr y pruebas bioquímicas. A su vez, en cultivo sumergido con medio mínimo de sales y glucosa como fuente de carbono se obtuvo el polímero, cuya naturaleza química se determinó mediante cromatografía de gases con detector selectivo de masas GC-MS/SJM. El 1,6% de las bacterias presentó potencial para producir PHA, identificándose *Bacillus megaterium* (50%), *B. mycoides* (25%) y *Gordonia* sp. (25%). El gen *phaC* se detectó en *B. megaterium*, cuantificándose $63,8 - 95,3 \text{ mg g}^{-1}$ de PHB. Las bacterias aisladas tienen potencial para la producción de PHA a partir de residuos agroindustriales (Sánchez, Marin, Mora y Yepes, 2012).

Los polihidroxicanoatos son bioplásticos termoestables sintetizados por algunas bacterias. Con el objetivo de identificarlas se procesaron muestras de lactosuero, melaza, cachaza y bagazo de caña de azúcar. El aislamiento se realizó en medio mínimo de sales suplementado con glucosa al 2% y 1 mL de Rojo Nilo (0,1%). Las colonias que presentaron fluorescencia a 340 nm se investigaron nuevamente mediante microscopía de fluorescencia con azul nilo. Las bacterias positivas en ambas pruebas, consideradas como productoras de PHA, se identificaron por secuenciación de la región 16S del ADN ribosomal y en algunas seleccionadas se investigó la presencia del gen Pha C, mediante PCR. Se detectaron 38 cepas de bacterias productoras de PHA, identificándose *Lactococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Enterococcus* en lactosuero, así como *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Klebsiella* y *Gluconobacter* en los subproductos de caña de azúcar. El gen Pha C se detectó en 16 cultivos de bacterias que presentaron los arreglos genéticos I y IV. Se concluyó que estas bacterias son promisorias para la producción de PHA (Cardona et al., 2013).

La búsqueda de sustratos económicos para la producción de PHA permitirá comercializarlo a gran escala. Con este objetivo, se investigó la producción de PHA por *Bacillus* spp. y *Lactococcus lactis* en glicerol grado reactivo (GGR), glicerol residual (GRSB) subproducto de la producción de biodiesel a partir de aceite de palma, lactosuero, aceite de *Jatropha* sp., ricino y frituras. El proceso fermentativo se realizó en matraces, con un volumen de trabajo de 50 mL, alcanzándose 3,53g L⁻¹ de biomasa; 3,06 g PHB L⁻¹; con un Y p/s de 204,1 mg PHB g⁻¹. En la optimización del proceso se cuantificaron 2,80g PHB L⁻¹ con 15g L⁻¹ de GRSB, pH 7,0 y 25 °C. Se demostró que la producción de PHA por *Bacillus megaterium* en GRSB es promisorio para disminuir los costos del polímero (Gómez, 2013).

2.2 Base teórica

Los plásticos son polímeros obtenidos por la condensación orgánica de diferentes monómeros, con pérdida de una molécula de agua. Se agrupan en termoplásticos, elastómeros y termoestables. Bioplásticos son todos los polímeros con propiedades plásticas, parecidas a las de un polímero termoplástico, pero no proceden del petróleo sino de una fuente orgánica renovable. El protocolo EN13432 establecido por la “International Standard Organization” (ISO) describe las características que un plástico debe cumplir para ser considerado biodegradable (Cerrone, 2011).

Los PHA son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos o poliésteres lineales de ácidos (R)-3- hidroxicarboxílicos (R) – HA (Figura 18) que algunas Bacteria y Archaea acumulan intracelularmente como material de reserva, para usarlo posteriormente como fuente de carbono y energía. La polimerización de los ácidos hidroxialcanoicos, por acción de enzimas intracelulares tiene lugar mediante condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxialcanóico) con el grupo hidroxilo del siguiente, formándose un enlace éster, de allí que también se les conozca como biopoliésteres (Cerrone, 2011). Los PHA tienen alto grado de polimerización, 60 a 80% de cristalinidad y son activos ópticamente porque presentan un carbono quiral, son isotácticos, es decir están conformados por unidades repetidas estereoquímicamente regulares y son insolubles a agua (Cerrone, 2011, González et al., 2013).

Los PHA se clasifican, dependiendo del número de carbonos en cada monómero, en PHA de cadena corta (scl, short-chain-length) con 3 a 5 átomos de carbono, como el Poli-3-hidroxivalerato [P (3 HV)] y el Poli – 3 – hidroxibutirato [P (3 HB)]; PHA de cadenamedia (mcl, medium-chain-length) con 6 a 14 carbonos, como el copolímero

poli – 3 (HB- CO- HV) y PHA de cadena mixta (PHAMCM), que combinan monómeros de cadena corta y cadena media como el Poli (3HB- CO- 3HV- CO- 3HHX).

Los PHA se pueden presentar como homopolímeros o copolímeros. Dependiendo también del tipo de microorganismo y las fuentes de carbono usadas, se han descrito más de 100 unidades monoméricas (Tabla 1) como constituyentes de los PHA (Stubble & Tian, 2003; Gómez, 2013; González et al., 2013). Los PHA tienen características físicas similares (Tabla 2), al polipropileno y polietileno de baja densidad (PEBD). Son insolubles en agua, termoplásticos y elastoméricos.

$$\left[\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ - \text{O} - \text{C} - (\text{CH}_2)_n - \text{C} - \\ | \quad \quad || \\ \text{R} \quad \quad \text{O} \end{array} \right]$$

<i>n</i>	R	Nombre del polímero	Símbolo
1	Hidrógeno	Poli (3-hidroxipropionato)	PHP
	Metil	Poli (3-hidroxibutirato)	P3HB
2	Hidrógeno	Poli (4-hidroxibutirato)	P4HB
3	Hidrógeno	Poli (5-hidroxivalerato)	P5HV

Figura 19. Estructura química de polihidroxicanoatos producidos por bacterias (Gómez, 2013).

La mayoría son parcialmente cristalinos en los que la variabilidad reside en la longitud y naturaleza de la cadena lateral de cada monómero, así como de la proporción en la que cada tipo de monómero se encuentra en el polímero (Fernández, 2012).

Tabla 1. Principales monómeros que conforman los PHA producidos por microorganismos

Símbolo	Monómero	N°de carbonos	Posición del grupo Carboxilo
3HP	Acido 3-hidroxi-propiónico	3	3
3HB	Acido 3-hidroxi-butírico	4	3
3HV	Acido 3-hidroxi-valérico	5	3
3HHx	Acido 3-hidroxi-hexanoico	6	3
3HHp	Acido 3-hidroxi-heptanoico	7	3
3HO	Acido 3-hidroxi-octanoico	8	3
3HN	Acido 3-hidroxi-nonanoico	9	3
3HD	Acido 3-hidroxi-decanoico	10	3
3HUD	Acido 3-hidroxi-undecanoico	11	3
3HDD	Acido 3-hidroxi-dodecanoico	12	3
3HTD	Acido 3-hidroxi-tetradecanoico	14	3
3HHxD	Acido 3-hidroxi-hexadecanoico	16	3
4HB	Acido 4-hidroxi-butírico	4	4
4HV	Acido 4-hidroxi-valérico	5	4
4HHx	Acido 4-hidroxi-hexanoico	6	4
4HHp	Acido 4-hidroxi-heptanoico	7	4
4HO	Acido 4-hidroxi-octanoico	8	4
4HD	Acido 4-hidroxi-decanoico	10	4
5HV	Acido 5-hidroxi-valérico	5	5
5HHx	Acido 5-hidroxi-hexanoico	6	5
6HDD	Acido 6-hidroxi-dodecanoico	12	6

Fuente: González et al.,(2013)

Tabla 2. Propiedades físicas de diferentes tipos de PHA y su comparación con las observadas en plásticos derivados del petróleo

Polímero	Temperatura de fusión (°C)	Módulo de Young (GPa)	Fuerza tensil (MPa)	Elongación (%)	Temperatura de transición (°C)
P(3HB)	179	3.5	40	5	4
P(3HB-co-3HV)					
3 mol % 3HV	170	2.9	38	*	*
14 mol % 3HV	150	1.5	35	*	*
25 mol % 3HV	137	0.7	30	*	*
P(3HB-co-4HV)					
3 mol % 4HV	166	*	28	45	*
10 mol % 4HV	159	*	24	242	*
64 mol % 4HV	50	30	17	591	*
P(4HB)	53	149	104	1000	*
P(3HHx-co-3HO)	61	*	10	300	*
P(3HB-co-3HHx)	52	*	20	850	-4
Polipropileno	170	1.7	34.5	400	45
Polietileno-tereftalato	262	2.2	56	7300	3400
Poliestireno	110	3.1	50	*	21
Nylon- 6,6	265	2.8	83	60	*

Fuente: González et al. (2013).

2.2.1 Biosíntesis de PHA

Los PHA se han definido como biopolímeros de reserva de fuente de carbono y energía; sin embargo, también se relacionan con la adaptación y supervivencia en nichos ecológicos muy competitivos; con la resistencia a condiciones desfavorables, incluyendo frío y calor, radiación UV, desecación, presión osmótica y diferentes compuestos químicos. También se relacionan con señales que desencadenan la formación de esporas y quistes en las interacciones entre

microorganismos en la formación de biopelículas y en la relación tipo simbiosis entre plantas y microorganismos rizosféricos (Serrano, 2010; Fernández, 2012).

Los PHA se acumulan como polímeros líquidos, móviles y amorfos en forma de gránulos, que se alojan en el citoplasma microbiano, rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contiene polimerasas y despolimerasas (González et al., 2013). Los PHA se disponen formando gránulos de naturaleza hidrofóbica rodeados por una membrana lipídica, en la que se encuentran ancladas proteínas implicadas en su metabolismo, denominadas GAP (granule associated protein) (Fernández, 2012).

El número de gránulos por célula se define en las primeras etapas de acumulación y la producción del polímero cesa cuando su contenido alcanza cerca del 80% del peso celular en base seca, concluyéndose que existen restricciones físicas que impiden a la célula acumular más polímero, a pesar de disponibilidad de sustrato y actividad de la PHA polimerasa (González et al., 2013).

2.2.2 Rutas metabólicas

Los PHA provienen básicamente de tres vías metabólicas: la degradación de azúcares mediante la obtención de acetil CoA, la degradación de ácidos grasos (β – oxidación) y la biosíntesis de ácidos grasos. El PHA más estudiado es el P3HB producido por *Ralstonia eutropha*. El proceso metabólico para la producción de PHA de cadena corta a partir de carbohidratos (Figura 19) comienza con el acetil – CoA, en una secuencia de tres reacciones catabolizadas por las enzimas 3 – cetotiolasa, acetoacetil – CoA y la poli (3 – hidroxibutirato) sintasa. En primer lugar la condensación de dos moléculas de acetil CoA origina acetoacetil CoA mediante una β - cetoacil CoA tiolasa (acetil CoA acetiltransferasa, EC 2.3.1, 9). A continuación, el acetoacetil CoA es reducido de manera estereoselectiva a (R)- 3- hidroxibutiril-CoA por una

deshidrogenasa dependiente de NADPH (acetoacetyl CoA reductasa: hidroxibutiril CoA deshidrogenasa, EC 1.1.1.36). Por último los monómeros de (R)-3-hidroxibutiril-CoA son polimerizados por la polimerasa de PHB o poli (3-hidroxibutirato) sintasa (Serrano, 2010; Cerrone, 2011; Gómez, 2013).

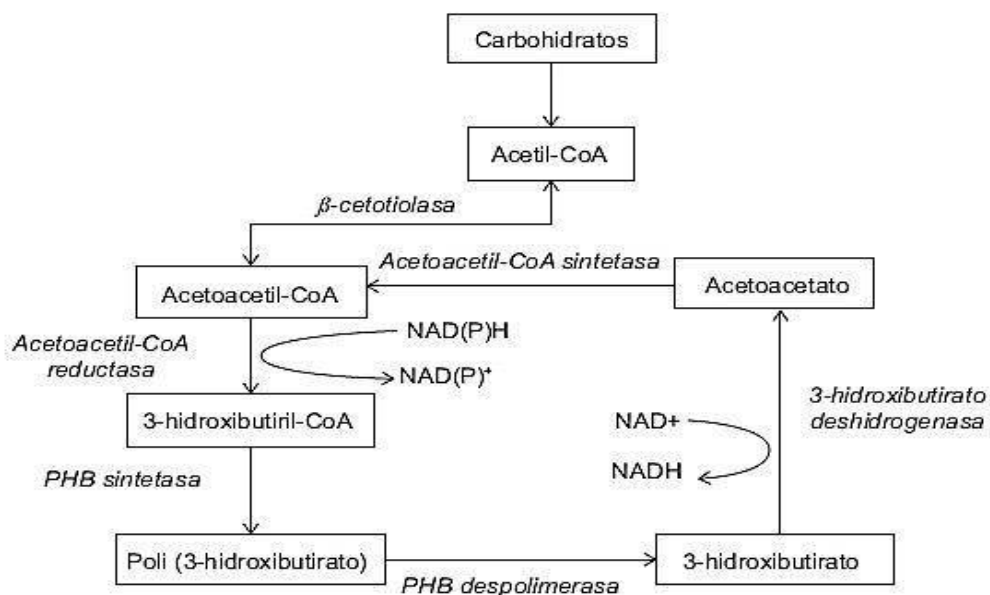


Figura 20. Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de P3HB a partir de carbohidratos (González et al., 2013).

La regulación de la producción de PHB a nivel enzimático ha sido estudiada en *R. eutropha*. Las concentraciones intracelulares de CoA y acetil – CoA tienen un papel esencial en la síntesis, el CoA libre inhibe la β – cetotiolasa. La síntesis de PHB es estimulada por niveles elevados de NAD (P) H o de la tasa NAD (P) H/NAD (P), lo cual parece estar conectado con un enlentecimiento del ciclo de Krebs del CAT, vía una inhibición de la citrato sintasa por NAD. En cuanto a la regulación a nivel transcripcional la expresión de los genes pha A, pha B, pha C, pha R y pha Z es constitutiva, porque se transcriben en todas las etapas de crecimiento,

producción y degradación de PHB. Por su parte, la producción de la fasina Pha P parece regulada porque no se detecta fasina libre en la célula, sino que se produce en los niveles requeridos para la unión del gránulo. Esta regulación parece estar mediada por Pha R (Fernández, 2012).

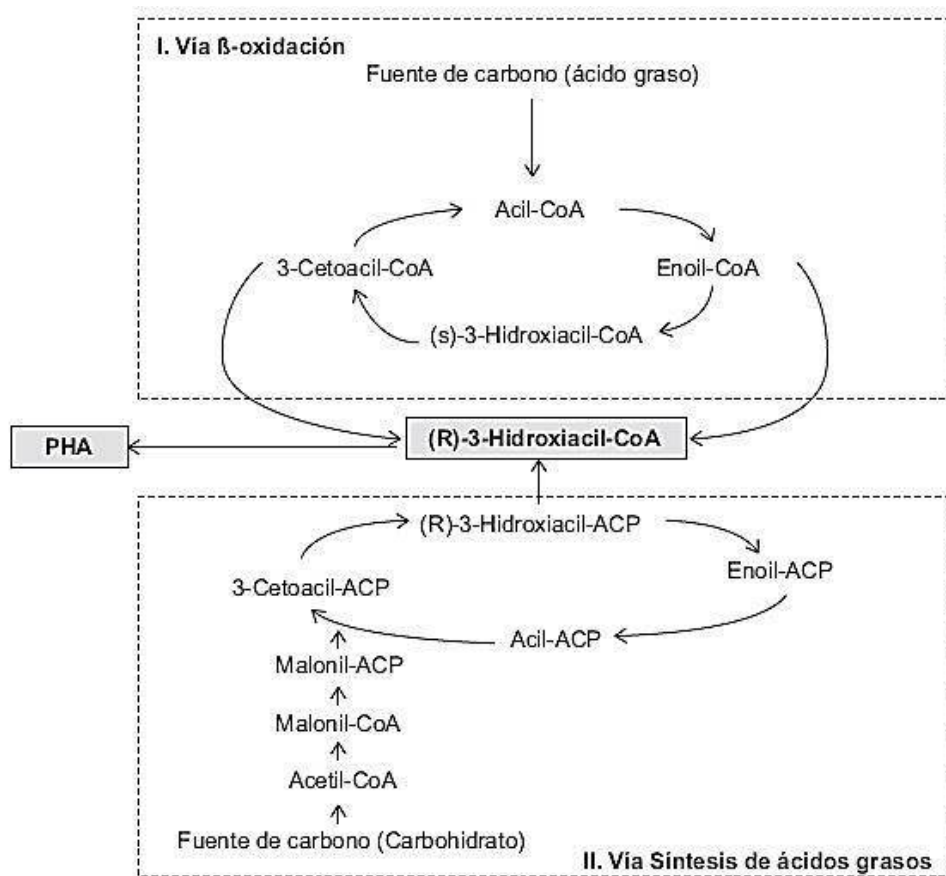


Figura 21. Ruta para la síntesis de PHA de cadena media en *Pseudomonas* spp. a partir de ácidos grasos y carbohidratos (González et al., 2013).

Existen más de 300 especies de bacterias productoras de PHA, mencionándose *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Cupriavidus*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Halomonas*, *Haloferax*, entre otras. Las bacterias productoras de PHA se agrupan según las condiciones para la síntesis del polímero. El primer grupo requiere la limitación de un nutriente esencial (N, P, S, Mg, O_2)

para sintetizar PHA a partir de un exceso de carbono. Se incluye *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas extorquens* y *P. oleovorans*, entre otras. El segundo grupo de bacterias productoras pueden acumular polímero en grandes cantidades durante de la fase de crecimiento. Se incluye *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* y *E. coli* recombinante (González et al., 2013).

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Bacterias aisladas de residuos orgánicos

En todas las muestras de residuos orgánicos se aislaron bacterias, en agar nutritivo (68) y en Mac Conkey (138), obteniéndose 206 cultivos puros, entre los que 61,7% (127) fueron Gram negativas y 38,3% (79) fueron Gram positivas (Figuras 22, 23). Entre los cultivos de bacterias Gram negativas el 5,8%(4) se aisló en agar nutritivo y el 89,1%(123) en Mac Conkey. Entre los cultivos de bacterias Gram positivas el 94,2%(64) se aisló en agar nutritivo y el 10,9%(15) en Mac Conkey. El mayor porcentaje (36%) de cultivos bacterianos se obtuvieron de los residuos de flores y el menor porcentaje (9%) de grasas de carnes (Figura 24).

3.2 Bacterias productoras de gránulos de PHA

En el 65% (134) de los cultivos bacterianos se observaron gránulos de PHA (Figuras 25, 26), en las células teñidas con Sudan Negro, correspondiendo el 50,7% (68) a bacterias Gram negativas y 49,3 %(66) a Gram positivas. En todas las bacterias, los gránulos se observaron grisáceos en el interior de las células vegetativas rosadas. Después de 60 horas de cultivo, en las bacterias Gram negativas se cuantificaron en promedio 100 a 135 células con gránulos de PHA por campo microscópico (Tabla 3) y en las Gram positivas 108 a 125 células con gránulos de PHA por campo microscópico (Tabla 4). El mayor porcentaje (40%) de cultivos bacterianos productores de gránulos de PHA se aislaron de flores y el menor porcentaje (7%) de grasas de carnes (Figura 27). Los diez cultivos bacterianos que presentaron el mayor número de células con gránulos de PHA, con un rango de 100 a 135 (Tabla 5) se seleccionaron para ser identificados.

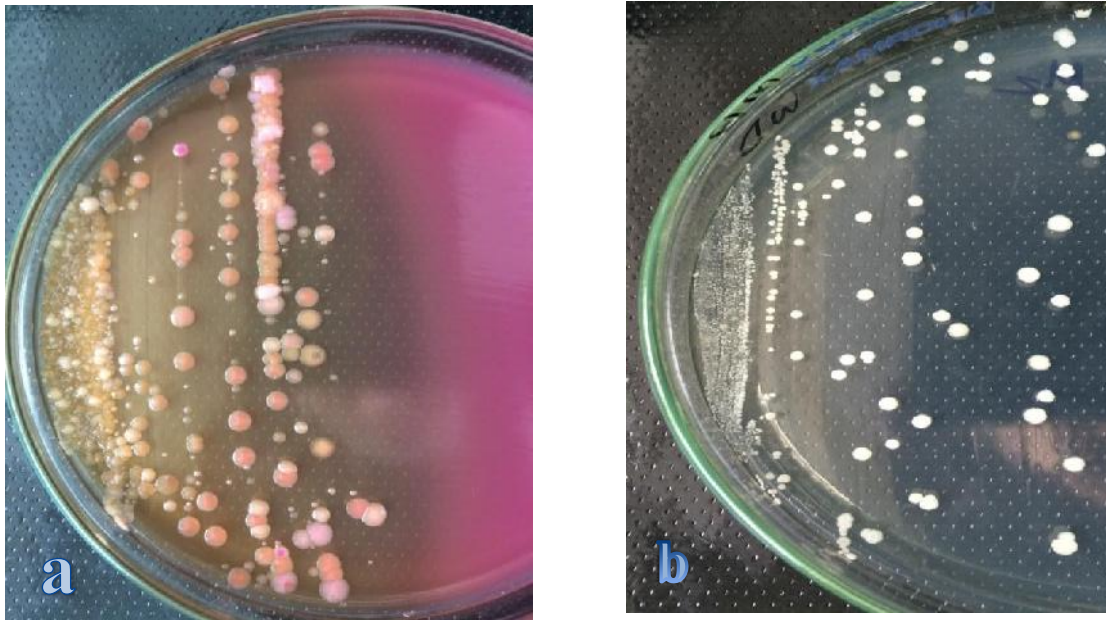


Figura 22. Bacterias desarrolladas en Agar Mac Conkey (a) y agar nutritivo (b).

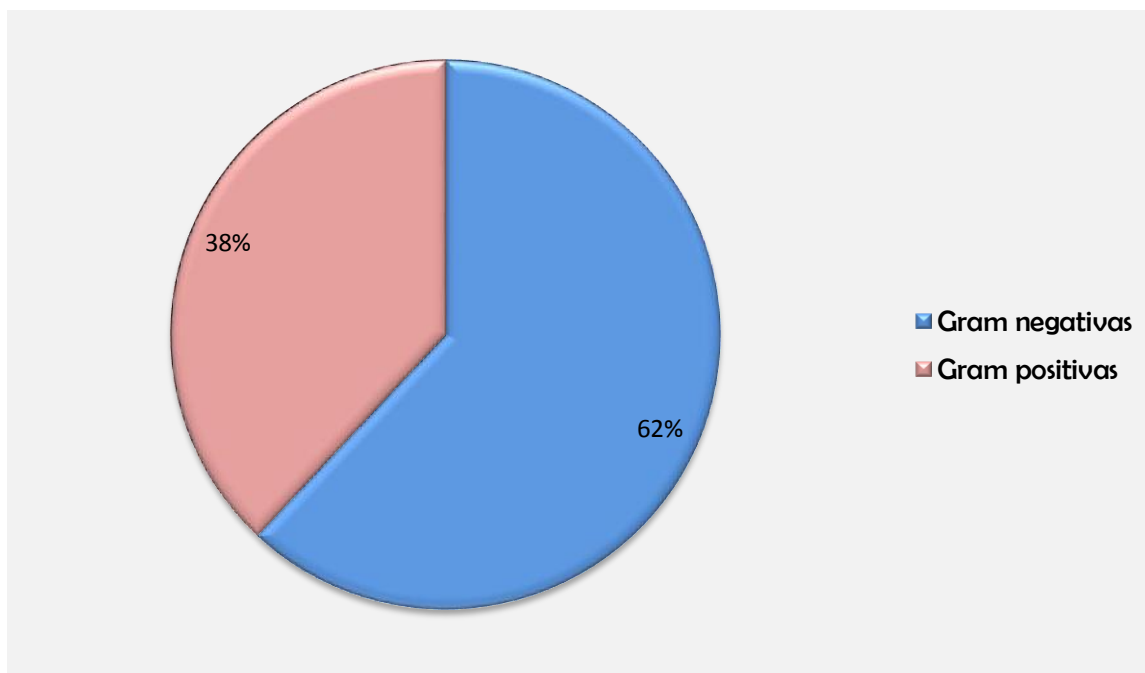


Figura 23. Frecuencia de bacterias Gram positivas y negativas aisladas de residuos orgánicos en Lambayeque, abril-noviembre, 2015.

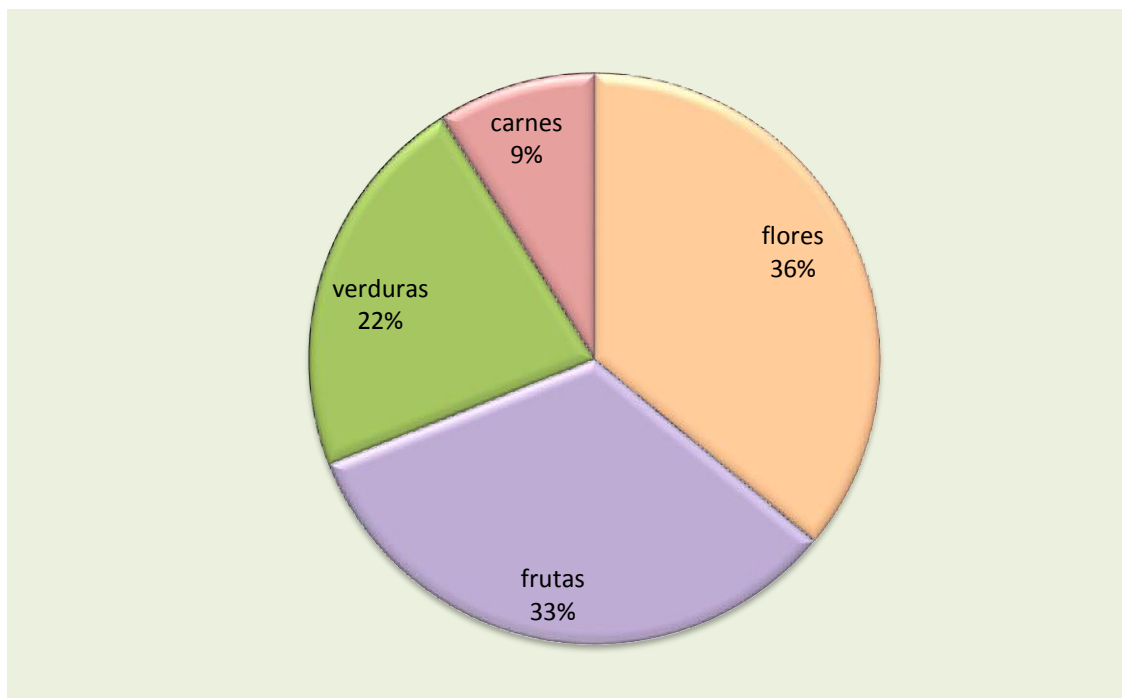


Figura 24. Porcentaje de cultivos bacterianos según residuo orgánico de procedencia en Lambayeque, abril-noviembre, 2015.



Figura 25. Gránulos de polihidroxialcanoatos en bacterias teñidas con Sudan Negro B.

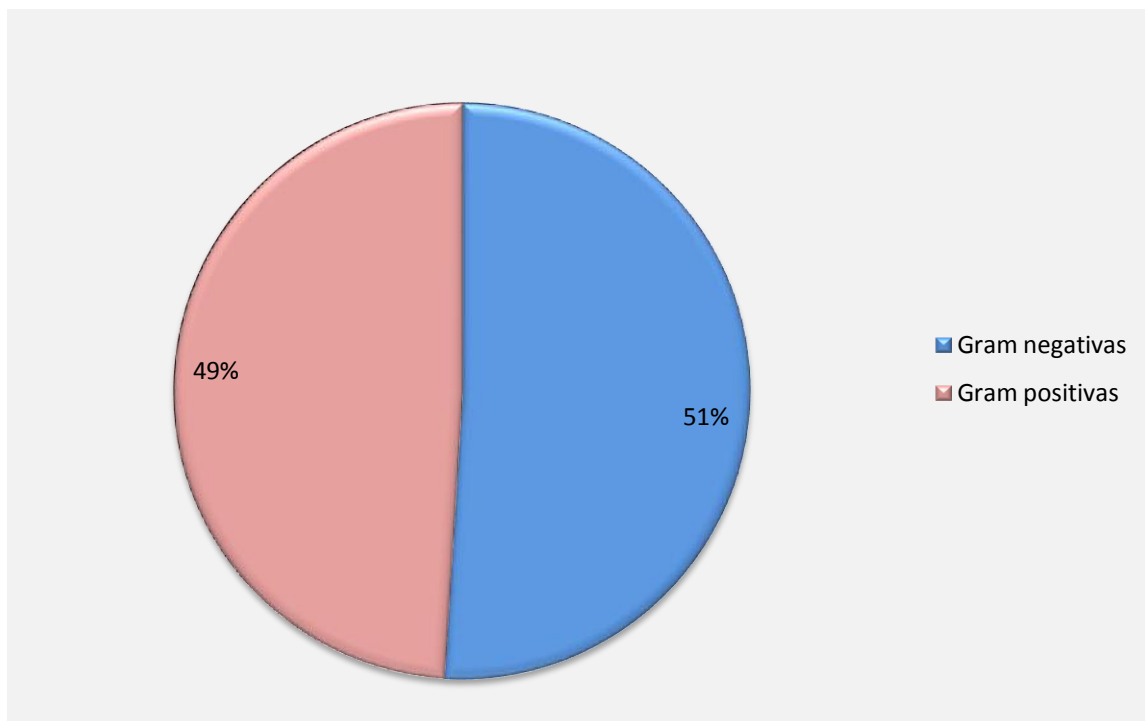


Figura 26. Frecuencia de bacterias Gram positivas y negativas productoras de gránulos de polihidroxialcanoatos en Lambayeque, abril-noviembre, 2015.

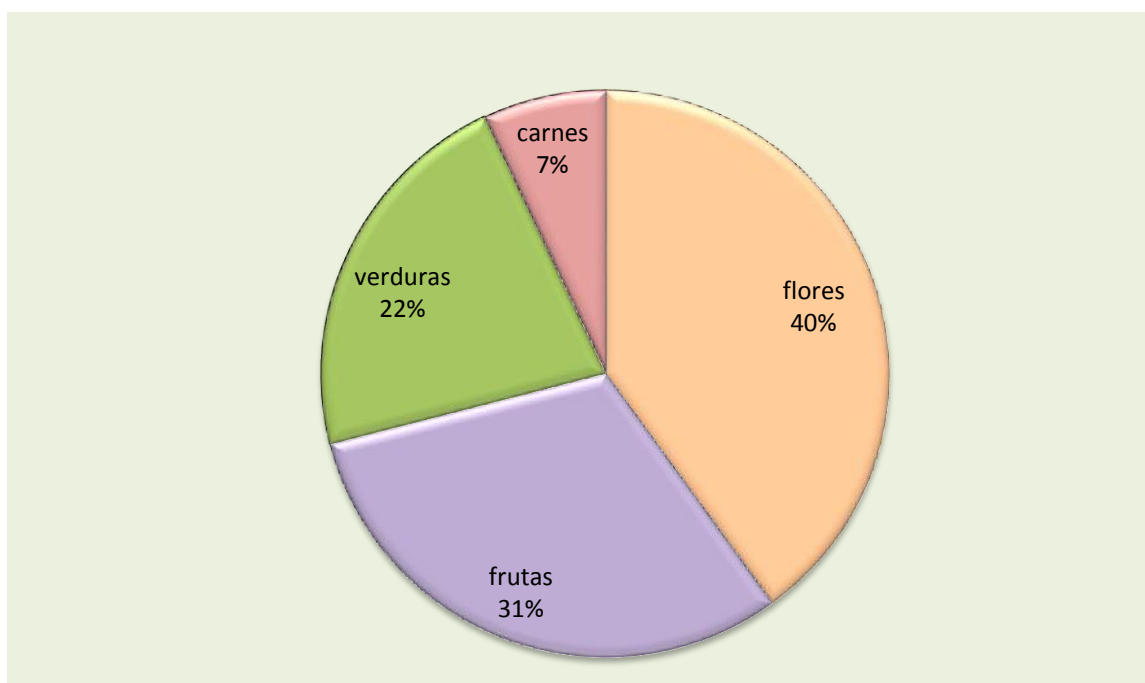


Figura 27. Porcentaje de bacterias productoras de gránulos de PHA según residuo orgánico de procedencia en Lambayeque, abril-noviembre, 2015.

Tabla 3. Número de células con gránulos de PHA en bacterias Gram negativas cultivadas en caldo Fermentación por 60 horas en Lambayeque, abril- noviembre, 2015

Bacterias código	Número de células con gránulos de PHA/campo microscópico					
	r1	r2	r3	r4	r5	X
RO073	134	128	140	133	142	135
RO093	115	130	124	98	132	120
RO112	98	110	116	97	120	108
RO039	112	92	108	110	98	104
RO199	90	100	90	110	122	102
RO137	93	90	110	98	120	102
RO026	95	98	100	100	90	97
RO236	90	98	100	90	95	95
RO214	90	92	85	81	95	89
RO222	85	88	90	86	92	88
RO179	89	85	92	82	90	88
RO045	75	78	82	71	88	79
RO040	78	74	81	86	72	78
RO059	75	82	85	70	74	77
RO105	80	77	75	82	72	77
RO050	75	73	64	72	68	70
RO189	65	60	70	72	77	69
RO129	70	69	65	68	71	69
RO077	65	69	62	70	74	68
RO195	70	68	66	70	65	68
RO113	60	65	60	71	74	66
RO120	60	52	68	75	64	64
RO027	70	68	42	70	67	63
RO123	40	38	43	35	37	39
RO223	40	38	36	42	37	39
RO160	33	35	40	44	37	38
RO127	35	32	40	41	37	37
RO130	34	35	40	38	32	36
RO069	35	32	40	39	31	35
RO161	30	39	35	34	37	35
RO012	35	33	30	28	36	32
RO181	35	32	28	36	30	32
RO249	35	33	30	29	28	31
RO102	28	32	27	30	38	31
RO075	28	35	22	36	32	31
RO063	30	28	26	33	28	29
RO218	30	25	29	28	32	29
RO148	30	28	25	23	29	27

Bacterias código	Número de células con gránulos de PHA/campo microscópico					
	r1	r2	r3	r4	r5	X
RO052	25	31	27	25	23	26
RO015	25	23	30	27	25	26
RO032	20	25	27	24	23	24
RO150	20	22	25	29	23	24
RO053	20	18	23	28	14	21
RO115	20	18	25	16	19	20
RO190	15	22	10	24	26	19
RO025	15	19	18	20	23	19
RO200	20	16	19	23	17	19
RO187	15	22	25	18	14	19
RO155	15	17	20	18	23	19
RO188	10	15	18	22	20	17
RO158	17	20	14	16	15	16
RO068	14	12	15	18	20	16
RO235	12	15	11	17	14	14
RO004	12	14	12	15	16	14
RO016	15	10	12	15	13	13
RO126	12	15	12	11	15	13
RO044	12	10	15	12	14	13
RO185	12	10	14	11	16	13
RO175	10	8	12	14	7	10
RO224	10	11	8	7	9	9
RO144	10	8	10	9	7	9
RO092	10	6	8	9	7	8
RO054	8	9	5	6	10	8
RO128	7	5	8	6	9	7
RO064	7	5	9	6	7	7
RO231	4	5	6	4	8	5
RO229	6	5	3	7	5	5
RO097	5	2	3	5	6	4

r: campo microscópico, X: promedio

Tabla 4. Número de células con gránulos de PHA en bacterias Gram positivas cultivadas en caldo Fermentación por 60 horas en Lambayeque, abril-noviembre, 2015

Bacterias código	Número de células con gránulos de PHA/campo microscópico					
	r1	r2	r3	r4	r5	X
RO165	122	124	130	128	125	126
RO098	120	124	122	118	127	122
RO062	121	117	124	129	119	122
RO009	118	122	120	113	115	118
RO089	115	110	120	118	121	117
RO085	111	107	112	109	114	111
RO141	108	100	110	115	119	110
RO088	105	102	110	108	115	108
RO043	100	102	113	108	116	108
RO227	98	107	110	114	109	108
RO001	97	110	113	99	116	107
RO028	96	112	118	99	106	106
RO002	98	109	99	111	114	106
RO234	102	100	97	95	109	101
RO042	95	100	102	99	104	100
RO055	100	95	113	93	97	100
RO159	93	98	104	97	102	99
RO079	92	94	91	97	93	93
RO208	88	86	95	97	89	91
RO206	86	83	95	93	89	89
RO065	74	83	77	94	98	85
RO167	78	85	79	86	94	84
RO021	74	82	78	89	88	82
RO118	72	78	81	80	73	77
RO132	69	75	79	81	80	77
RO072	65	73	76	68	72	71
RO018	64	68	76	71	69	70
RO084	62	70	67	64	68	66
RO142	59	62	64	71	72	66
RO228	64	56	62	69	54	61
RO151	55	61	58	64	66	61
RO111	65	59	57	55	62	60
RO031	59	63	67	51	55	59
RO145	48	55	62	57	60	56
RO005	47	56	49	57	61	54
RO178	48	54	49	58	56	53
RO006	49	53	57	48	55	52
RO019	49	52	46	57	52	51

Bacterias código	Número de células con gránulos de PHA/campo microscópico					
	r1	r2	r3	r4	r5	X
RO083	54	45	48	52	55	51
RO198	46	49	56	52	45	50
RO107	45	49	54	44	51	49
RO096	39	42	45	37	49	42
RO134	36	45	38	48	39	41
RO194	38	42	40	49	36	41
RO184	35	38	42	39	47	40
RO133	37	36	41	39	47	40
RO094	33	35	42	39	47	39
RO183	34	44	37	42	39	39
RO048	33	42	44	38	35	38
RO143	28	32	38	26	36	32
RO095	29	32	24	38	33	31
RO166	35	28	30	32	29	31
RO170	28	24	33	36	31	30
RO182	28	29	32	27	35	30
RO177	31	24	36	32	28	30
RO144	29	28	31	35	26	30
RO220	25	30	28	30	32	29
RO232	22	27	30	29	35	29
RO172	27	25	32	29	24	27
RO205	25	18	28	27	19	23
RO203	25	15	22	28	18	22
RO081	15	23	19	26	18	20
RO133	15	22	18	17	25	19
RO202	14	19	24	12	27	19
RO017	12	24	15	22	13	17
RO162	8	10	15	9	12	11

r: campo microscópico, X: promedio

Tabla 5. Cultivos de bacterias seleccionadas por el mayor número de gránulos de PHA en Lambayeque, abril-noviembre, 2015

Bacteria código	Tinción de Gram	Nº de células con gránulos
RO001	Positiva	125
RO062	Positiva	122
RO073	Negativa	135
RO093	Negativa	120
RO098	Positiva	122
RO112	Negativa	108
RO137	Negativa	102
RO165	Positiva	125
RO199	Negativa	100
RO227	Positiva	108

3.3 Bacterias seleccionadas e identificadas fenotípicamente

En las bacterias Gram positivas seleccionadas se identificó (Tabla 6) el género *Bacillus* (50%) y en las Gram negativas (Tabla 7) se identificaron *Burkholderia* (40%) y *Pseudomonas* (10%).

En el cultivo de las bacterias seleccionadas, se determinó un tiempo óptimo de incubación de 36 horas (Tabla 8), en el cual se diferenciaron claramente las células con gránulos de PHA y después del cual el número de estas células disminuyó. El número de células con gránulos de PHA fue 68 a 131 (24 horas), 97 a 158 (36 horas), 90 a 146 (48 horas), 90 a 136 (60 horas) y 78 a 116 (72 horas).

3.4 Rendimiento de PHA

Con los valores de absorbancia (Tabla 9) obtenidos con diferentes concentraciones de biomasa de las bacterias cultivadas en el Caldo Fermentación se obtuvo la ecuación $Y=0,4777x + 0,0656$ (Figura 28) y debido a que el valor R^2 fue mayor de 0,9 se aceptó como patrón de referencia para el cálculo de la concentración de biomasa (Mantilla, 2007).

En el proceso fermentativo, la absorbancia de la biomasa bacteriana a las 36 horas osciló entre 0,084 con *Bacillus* sp. RO062 y 1,298 con *Burkholderia* sp. RO199 (Tabla 10), valores correspondientes a 0,039 y 2,580 gL⁻¹ de biomasa (Tabla 11), respectivamente. Con la biomasa tratada se recuperó el polímero PHA (Figura 29), cuya naturaleza fue verificada, obteniendo un pico máximo de absorbancia a 235 nm. La concentración de PHA fue de 0,003 gL⁻¹ con *Bacillus* sp. RO062 y 0,628 gL⁻¹ con *Bacillus* sp. RO227 (Tabla 12). El rendimiento (Y_p/x) fue de 0,077 gg⁻¹ con *Bacillus* sp RO062 y 0,751 gg⁻¹ con *Bacillus* sp. RO227, valores correspondientes a 7,70 y 75,18%, de acumulación de PHA respectivamente (Tabla 12).

Tabla 6. Características diferenciales del género *Bacillus*

Características	<i>Bacillus sp.</i>
Células	Bacilos rectos
Tinción de Gram	+
Motilidad	+
Oxidasa	-
Catalasa	+
Utilización de citrato	+
Acidez en glucosa	+
Acidez en manitol	+
Acidez en xilosa	-
Acidez en arabinosa	-
Hidrólisis de almidón	+
Hidrólisis de lecitina	-

Tabla 7. Características diferenciales de los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas*

Características	<i>Burkholderia sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
Células	Bacilos	Bacilos
Tinción de Gram	-	-
Motilidad	+	+
Oxidasa	+/-	+/-
Catalasa	+	+
Descarboxilación de lisina	+/-	+/-
Reducción nitratos	+	+
Utilización de citrato	+	+
Producción de indol	-	-
Sensibilidad a la polimixina	-	+

Tabla 8. Número de células bacterianas con gránulos de PHA en diferentes tiempos de incubación en Lambayeque, abril-noviembre, 2015

Bacterias Código	Tiempo (horas)				
	24	36	48	60	72
<i>Burkholderia</i> sp. RO199	123	143	125	110	93
<i>Bacillus</i> sp. RO001	65	97	90	92	86
<i>Pseudomonas</i> sp. RO093	131	158	146	132	116
<i>Burkholderia</i> sp. RO073	128	152	145	136	108
<i>Burkholderia</i> sp. RO112	105	122	105	90	88
<i>Burkholderia</i> sp. RO137	102	98	95	96	78
<i>Bacillus</i> sp. RO227	107	100	95	96	85
<i>Bacillus</i> sp. RO098	126	146	138	123	97
<i>Bacillus</i> sp. RO165	108	132	127	124	110
<i>Bacillus</i> sp. RO062	115	143	125	114	96

Tabla 9. Valores de absorbancia (600nm) de biomasa de bacterias productoras de PHA

Biomasa (gL⁻¹)	Absorbancia (600nm)
2,085	1,062
0,2085	0,160
0,02085	0,084
0,002085	0,063

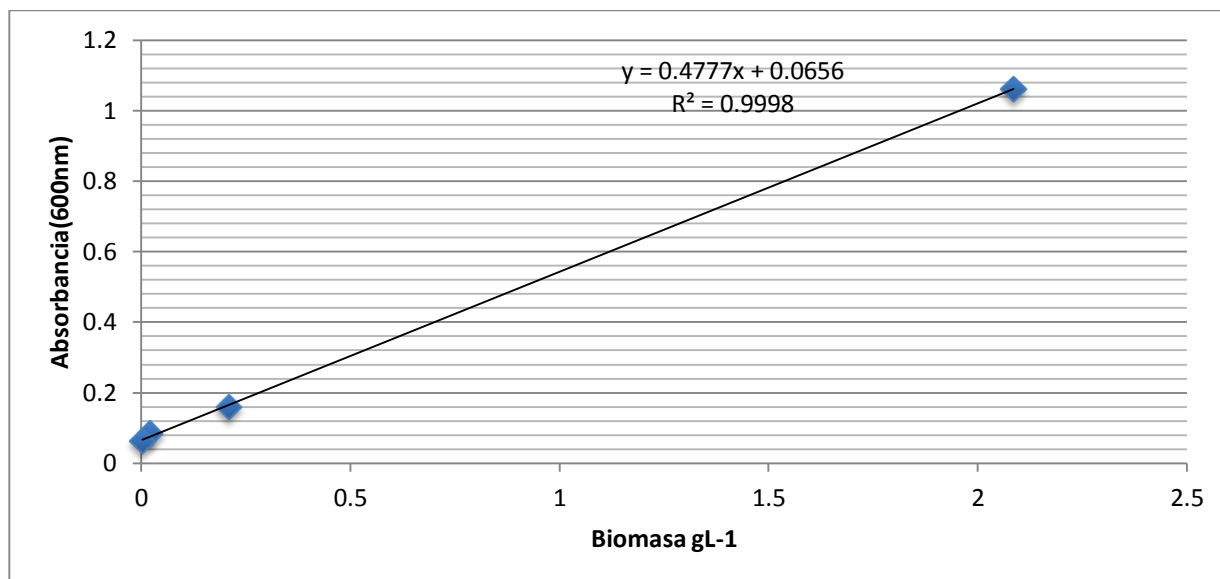


Figura 28. Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de bacterias productoras de PHA.

Tabla 10. Absorbancia (600nm) de biomasa de bacterias productoras de PHA

Bacterias código	Absorbancia 600nm (horas)		
	36	48	60
<i>Burkholderia</i> sp. RO199	1,298	0,886	1,029
<i>Bacillus</i> sp. RO001	1,285	0,349	0,331
<i>Pseudomonas</i> sp.RO093	1,245	1,110	1,185
<i>Burkholderia</i> sp. RO073	0,979	0,983	1,111
<i>Burkholderia</i> sp. RO112	0,934	1,173	1,406
<i>Burkholderia</i> sp. RO137	0,812	0,712	0,635
<i>Bacillus</i> sp. RO227	0,465	0,487	0,374
<i>Bacillus</i> sp. RO098	0,162	0,131	0,126
<i>Bacillus</i> sp. RO165	0,137	0,156	0,094
<i>Bacillus</i> sp. RO062	0,084	0,067	0,099

Tabla 11. Concentración (gL^{-1}) de biomasa de bacterias productoras de PHA en Lambayeque, abril-noviembre, 2015

Bacterias código	Biomasa(gL^{-1}) /horas		
	36	48	60
<i>Burkholderia</i> sp. RO199	2,580	1,717	2,017
<i>Bacillus</i> sp. RO001	2,553	0,593	0,556
<i>Pseudomonas</i> sp. RO093	2,470	2,186	2,343
<i>Burkholderia</i> sp. RO073	1,912	1,920	2,188
<i>Burkholderia</i> sp. RO112	1,818	2,318	2,806
<i>Burkholderia</i> sp. RO137	1,562	1,353	1,192
<i>Bacillus</i> sp. RO227	0,836	0,882	0,646
<i>Bacillus</i> sp. RO098	0,202	0,137	0,126
<i>Bacillus</i> sp. RO165	0,149	0,189	0,059
<i>Bacillus</i> sp. RO062	0,039	0,003	0,070



Figura 29. Polihidroxiálcanoato, PHA, producido por *Bacillus* sp. RO227 en Lambayeque, abril- noviembre, 2015.

Tabla 12. Rendimiento Y (p/x) de polihidroxialcanoatos por bacterias aisladas de residuos orgánicos en Lambayeque, abril-noviembre, 2015

Bacterias		Rendimiento		
Código	Biomasa (g L⁻¹)	PHA (g L⁻¹)	Y(p/x)	
			(g g⁻¹)	(%)
<i>Bacillus</i> sp. RO227	0,836	0,628	0,751	75,18
<i>Burkholderia</i> sp. RO137	1,562	1,070	0,685	68,59
<i>Burkholderia</i> sp. RO199	2,580	1,553	0,594	59,40
<i>Burkholderia</i> sp. RO112	1,818	1,049	0,577	57,77
<i>Pseudomonas</i> sp. RO093	2,470	1,065	0,431	43,16
<i>Burkholderia</i> sp. RO073	1,912	0,744	0,389	38,96
<i>Bacillus</i> sp. RO165	0,149	0,038	0,255	25,50
<i>Bacillus</i> sp. RO098	0,202	0,031	0,153	15,35
<i>Bacillus</i> sp. RO001	2,553	0,319	0,125	12,50
<i>Bacillus</i> sp. RO062	0,039	0,003	0,077	7,70

Y: rendimiento, p: producto, x: biomasa

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

En los residuos orgánicos se aislaron e identificaron bacterias productoras de gránulos de PHA, con un rendimiento de hasta $0,751 \text{ gg}^{-1}$, lo que significa que el 75% del peso de la biomasa correspondió al PHA y con este resultado se cumplió la hipótesis de la presente investigación. De esta manera, se le da un valor agregado a los residuos orgánicos, donde se encuentra una diversidad de microorganismos que metabolizan los nutrientes disponibles y cuando los procesos de descomposición no son controlados se favorece la emisión de productos contaminantes con riesgo potencial para la salud y el ambiente (Kofalusi y Aguilar, 2006).

La presencia de bacterias productoras de gránulos de PHA, en los residuos orgánicos se explica porque en su mayoría éstos presentan desbalance en los contenidos de carbono y nitrógeno, condiciones favorables para la producción de PHA (Baca et al., 2010). Coincidiendo al respecto, Cardona et al. (2013) aislaron estas bacterias de lactosuero derivados de la producción de queso, melaza, cachaza y bagazo de caña de azúcar, así como Gómez (2013) de subproductos de la producción de biodiesel a partir de aceite de palma y aceite de frituras y Arroyave, Cardona y Agudelo, (2013) de lodos activados. La síntesis del polímero tiene lugar en respuesta a una limitación de nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio u oxígeno, en presencia de un exceso de fuentes de carbono; sin embargo, también existen bacterias que no requieren la limitación de nutrientes para la síntesis de PHA y pueden acumularlo durante la fase de crecimiento (González et al., 2013).

La predominancia de los cultivos bacterianos productores de PHA en uno de los sustratos investigados también fue observada por Cardona et al. (2013). Estos investigadores obtuvieron el mayor porcentaje de aislados y morfotipos bacterianos en el sustrato cachaza de caña, seguido de melaza y con menor porcentaje en lactosuero.

El glicerol fue la fuente de carbono para la producción de gránulos de PHA por las bacterias aisladas de residuos orgánicos, coincidiendo con Fernández (2012), Becerra (2013) y Gómez (2013). La composición del polímero PHA depende de la fuente de carbono del medio de cultivo utilizado durante la fermentación bacteriana (Jung, Hazenberg, Prieto & Witholt, 2001, mencionados por Fernández, 2008). La glucosa se puede utilizar como fuente de carbono (Arroyave et al., 2013., Cardona et al., 2013), pero también aceites de *Jatropha*, ricino y frituras, lactosuero (Gómez, 2013), miel de caña o remolacha (Bello et al., 2008), residuos de la producción de biodiesel (Becerra, 2013), efluentes industriales (Cuesta, 2014), priorizándose el uso de sustratos fácilmente disponibles y de bajo costo, que posibilitan la obtención de PHA a precios competitivos (Gómez, 2013).

La observación de gránulos de PHA en las bacterias teñidas con Sudan Negro B coincide con Baca et al. (2010), Cerrone (2011), Arroyave et al. (2012), Cuesta (2014) y Guzmán et al. (2017). Los gránulos de PHA están compuestos por un poliéster (93-9% del peso seco del gránulo, PSG), rodeado por una monocapa fosfolipídica (1-6% PSG) y proteínas asociadas al gránulo (1-2% PSG) que forman una fina capa en la superficie del gránulo (González et al., 2013).

Debido a su naturaleza lipídica, la detección de bacterias productoras de PHA se fundamenta en la utilización de colorantes lipofílicos como el Sudan Negro B (Baca et al., 2010), azul Nilo A (Cerrone, 2011) y su oxazoma fluorescente, rojo Nilo (Cardona et al., 2013). Las

pruebas moleculares confirmativas basadas en PCR detectan la presencia de uno (pha C) o varios de los genes de la síntesis de PHA (Cardona et al., 2013).

La producción de PHA se ha demostrado en especies de los tres dominios de seres vivos: arqueas (Guzmán et al., 2017), bacterias (Baca et al., 2010) y eucariotas (Khanma y Srivastava, 2005), metabólicamente muy diversas y distribuidas ampliamente en la naturaleza (Fernández, 2012). Los géneros de bacterias identificadas como productoras de PHA fueron reportados previamente por Gómez, 2013. (*Bacillus* sp.), Méndez, 2016 (*Burkholderia* sp.) y Fernández, 2012 (*Pseudomonas* sp.).

La disminución del número de células con gránulos de PHA fue reportada previamente por Baca et al. (2010) y Guzmán et al. (2017). La degradación intracelular de los gránulos de PHA es una respuesta endógena de la bacteria que le permite hidrolizar el PHA o reservas de carbono a monómeros, mediante la participación de las despolimerasas intracelulares (González et al., 2013)

Transcurridos 36 horas de fermentación se cuantificó el mayor número de células con gránulos de PHA en las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*. Similar tiempo fue considerado óptimo para la producción de PHA por *B. megaterium* en glucosa como fuente de carbono (Gómez, 2013); no obstante, el período puede disminuir a 20 horas (Bello et al., 2008) o incrementarse hasta 40 horas (Guzmán et al., 2017), dependiendo de la cepa microbiana, fuente de carbono y condiciones de fermentación.

La biomasa (g L^{-1}) bacteriana determinada por turbidimetría es un parámetro que estima el crecimiento de los microorganismos (Cerrone, 2011; Becerra, 2013) y que se requiere para el cálculo del rendimiento ($Y_{p/x}$) de producto PHA en función de la biomasa (Guzmán et al., 2017). En los cultivos de bacterias productoras de PHA la monitorización de la

biomasa por turbidimetría no es un reflejo directo del número de células. En estos casos el valor de la DO_{600} es un parámetro complejo, que relaciona al número de células y la cantidad de PHA que contiene (Fernández, 2008).

Los mayores rendimientos de PHA correspondientes a *Bacillus* sp. RO227 ($0,751\text{gg}^{-1}$) y *Bulkholderia* sp. RO137 ($0,685\text{gg}^{-1}$) evidenciaron que el 75,1 y 68,5% de la biomasa correspondió al PHA, valores cercanos a 78% reportado para *Bacillus* sp. por Garnique y Sandoval (2016). La rentabilidad de la producción de PHA requiere que la bacteria, acumule por lo menos el 60% de la masa celular con PHA (Dalcanton, 2006). Por esta razón, *Bacillus* sp. RO227 y *Burkholderia* sp. RO137 son promisorios para la producción de PHA a gran escala.

CONCLUSIONES

1. En los residuos orgánicos de los mercados de la provincia de Chiclayo se aislaron bacterias, obteniéndose 206 cultivos puros, correspondientes a los residuos de flores (36%), frutas (33%), verduras (22%) y grasas de carnes (9%).
2. En el 65% de los cultivos de bacterias se detectaron gránulos, utilizando la tinción Sudan Negro B.
3. Los diez cultivos de bacterias que alcanzaron el mayor número de células con gránulos de PHA se seleccionaron y se identificaron en los géneros *Bacillus* (50%), *Burkholderia* (40%) y *Pseudomonas* (10%).
4. El rendimiento de PHA en función de la biomasa ($Y_{p/x}$) fue de $0,077\text{gg}^{-1}$ (*Bacillus* sp. RO062) a $0,751\text{gg}^{-1}$ (*Bacillus* sp. RO227).

RECOMENDACIONES

1. Identificar a nivel molecular *Bacillus* sp. RO227 y *Burkholderia* sp. RO137.
2. Producir PHA con *Bacillus* sp. RO227 y *Burkholderia* ps. RO137 en biorreactores a escala piloto.
3. Determinar las características físicas y químicas de PHA producido por *Bacillus* sp. RO227 y *Burkholderia* sp. RO137.

CAPITULO V

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, P y Valderrama, M. (2014). *Caracterización de los géneros Burkholderia y Pseudomonas solubilizadoras de fosfato aislados de Zea mays L. en el distrito de Requena en Lambayeque, marzo-mayo, 2014*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Arroyave, A., Cardona, M.y Agudelo, L. (2013). Identificación de cepas nativas con potencial para obtención de polihidroxicanoatos-(PHAs) en lodos activados. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2 ,69 -76.
- Baca, K., Sánchez, M., Carreño, C. y Mendoza, G. (2010). Polihidroxicanoatos de cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” y *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1, 213 – 224.
- Baca, K y Sánchez, M (2010). Concentración de polihidroxicanoatos de cepas nativas de *Azospirillum* spp. Aisladas de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” y *Oryza sativa* L. “arroz”. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Bello, D., Zinn, M., Brandl, H. y Otero, M. (2008). Aislamiento y caracterización de Poli-B-hidroxibutirato obtenido por vía fermentativa a partir de *Bacillus megaterium*. *ICIDCA. Sobre los derivados de la Caña de Azúcar*, XLII (1-3), 101-105.
- Becerra, M. (2013). Producción de un polímero tipo polihidroxialcanoato (PHA) empleando residuos de la producción de biodiesel. (Tesis de Maestría). Universidad de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Cardona, A., Mora, A. y Marín, M. (2013). Identificación molecular de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos en subproductos de lácteos y caña de azúcar. *Revista Facultad Nacional de Agronomía_ Medellín*, 66 (2), 7129-7140.
- Cerrone, F. (2011). *Producción de poliésteres biopoliméricos (PHAs) desde alpeorajo por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.
- Collazos, A. y Ortiz, R. (2014) Hongos filamentosos nativos en la hidrólisis del bagazo de *Saccharum officinarum* L., caña de azúcar para la producción de etanol celulósico en Lambayeque, 2012. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Cuesta, F. (2014). Evaluación de los niveles de remoción en demanda química y bioquímica de oxígeno, y sólidos suspendidos totales de efluentes industriales con baterías productoras de polihidroxialcanoatos y exopolisacáridos a escala de laboratorio en empresas del sector de alimentos de la ciudad de Manizales. (Tesis de Maestría). Universidad de Manizales, Colombia.

- Dalcanton, F. (2006). Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* en diferentes substratos. (Tesis de Maestría). Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.
- Cholula, L. (2005). *Estudio de la producción de poli-β-hidroxibutirato (PHB) en Azospirillum brasilense Sp7*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, Tamaulipas, México.
- Dorán, P. (1998). *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A.
- Fernández, I. (2008). Estudio de las bases moleculares de la regulación del metabolismo de polihidroxialcanoatos en *Pseudomonas putida* KT 2442. (Tesis de Maestría). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Fernández, I. (2012). *Estudio del metabolismo de polihidroxialcanoatos en Pseudomonas putida: implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos funcionalizados*. (Tesis de Doctorado). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Fernández, P., Ortiz, F. y Edmundo, J. (2005). Caracterización de poli- (hidroxibutirato -co-hidroxivalerato) sintetizado por una cepa silvestre de *Bacillus mycoides* FLB2. *Revista Centro de Estudios en Salud*, 1(6), 5 – 12.
- Flores, A. e Idrogo, E. (2015). *Rendimiento de polihidroxialcanoatos, PHA, de bacterias halófilas aisladas en el suelo y aguas salinas en Mórrope, Lambayeque, 2014*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Flores, J y Benites, J. (2015). Efecto del estiércol de cuy, porcino y vacuno en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de diésel en terrarios. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Franco, Y., Gómez, G., Núñez, R. y Martínez, J. (2009). Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de polihidroxitirato por *Rhizobium tropici*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 40 (1), 53-57.
- Garnique, L. y Sandoval, L. (2016). Rendimiento de polihidroxicanoatos producidos por bacterias aisladas de bagazo de *Saccharum officinarum* L. en Lambayeque, abril-noviembre 2015.
- (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Gómez, J. (2013). *Producción y caracterización de polihidroxicanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- González, Y., Meza, J., González, O. y Córdova, J. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29 (1) 77-115.
- Guzmán, C. y Hurtado, A. (2011). Rendimiento de polihidroxicanoatos de bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de almidón contenido en cáscaras de *Solanum tuberosum*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C. y Casos, I. (2017). *Producción de polihidroxicanoatos por bacterias halófilas nativas utilizando almidón de cáscaras de Solanum tuberosum*.L. *Scientia Agropecuaria*, 8(2), 109-118.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2014). Metodología de la Investigación. (6ta.ed). México, McGraw Hill Interamericana, Editores, S.A.

- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. & Willians, S. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.). Estados Unidos: Lippincott Willians & Wilkins.
- Jung, K., Hazenberg, W., Prieto, M & Witholt, B. (2001). Two-stage continuous process development for the production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates). *Biotechnology Bioengineering* 72, 19-24.
- Khanma S. & Srivastaba A. Köfalusi Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40, 607-619.
- Kiss, G. y Encarnacion, G. (2006). Los productos y los impactos de la descomposición de residuos sólidos urbanos en los sitios de disposición final. *Gaceta Ecológica*, 79, 39-51.
- Mantilla, M. (2007). Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. Yoko ono) en período de enraizamiento. (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, Colombia.
- Méndez, D. (2016). Modelamiento matemático y optimización del proceso de producción de polihidroxiálcanoatos empleando la bacteria *Burkholderia cepacia* B17 a partir de ácidos grasos. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Municipalidad Provincial de Lambayeque. (2015). Ubicación geográfica de la Provincia de Lambayeque. Página web disponible en http://www.munilambayeque.gob.pe/ubicacion_geografica.php
- Olmedo, S. (2015). Elaboración de compost a partir de residuos sólidos orgánicos en el mercado mayorista del Cantón, Riobamba. (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

- Razzaq, A., Jamil, N., Naheed, N & Hasnain, S. (2010). Bacteria from contaminated urban and hilly areas as a source of polyhydroxyalkanoates production. *African Journal of Biotechnology*, 9(13), 1919-1925.
- Sánchez, S., Marin, M., Mora, A. y Yepes, M. (2012). Identificación de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV (2), 89-100.
- Serrano, J. (2010). Polihidroxialcanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *Revista Teoría y Praxis Investigativa*, 5 (2), 79-85.
- Stubbe, J. & Tian, J. (2003). Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. *Natural Product Reports*, 20(5), 445-457.

ANEXO 1

Cálculo de número de muestras de residuos sólidos para el aislamiento de bacterias productoras de PHA (Hernández et al., 2014)

$$n = \frac{z^2 (p \cdot q)}{t^2}$$

Donde:

n= Tamaño de muestra

z = 1,96 ($\alpha = 0,05$), valor estándar

p = Prevalencia de bacterias productoras de PHA en residuos orgánicos (0,90)

q = Ausencia (0,10)

t = Error permitido (8%)

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90 \cdot 0,10)}{(0,08)^2}$$

$$n = 54,02 \text{ muestras}$$

ANEXO 2

Medios de cultivo (gL⁻¹) para el aislamiento de bacterias productoras de granulos de PHA

a. Agar nutritivo (en Flores y Benites, 2015)

Componentes	gL ⁻¹
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Cloruro de sodio	8,0
Agar agar	15,0

* pH. 7,3 ± 0,2

b. Agar Mc Conkey (en Flores y Benites, 2015)

Componentes	gL ⁻¹
Peptona de carne	1,5
Peptona de gelatina	17,0
Tripteina	1,5
Lactosa	10,0
Sales biliares	1,5
Cloruro de sodio	5,0
Rojo neutro	0,003
Cristal violeta	0,001
Agar agar	13,5

* pH. 7,1 ± 0,2

c. Caldo Fermentación (en Becerra, 2013)

Componentes	gL⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,08g
Na ₂ HPO ₄	1,6g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0,5g
Solución de microelementos	1mL
Glicerol	5mL

-Solución de microelementos

Componentes	gL⁻¹
FeSO ₄	2,0g
CaCl ₂ .H ₂ O	2,0g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2g
CuCL ₂ .2H ₂ O	0,01g
NiCl ₃ .6H ₂ O	0,2g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1g
H ₂ BO ₄	0,3g
NaMoO ₄ .H ₂ O	0,03g

ANEXO 3

Preparación de Sudan Negro B

(Guzmán & Hurtado, 2011)

- Pesar 0,3 de Sudan Negro B
- Disolver en 74 mL de etanol al 95%
- Enrasar a 100 mL con agua destilada
- Filtrar